

NOTE TO USERS

Page(s) not included in the original manuscript and are unavailable from the author or university. The manuscript was scanned as received.

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Dysfonction myocardique endotoxinique : effets de la neutralisation du
Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

Par

FRÉDÉRIC CHAGNON

Département de pneumologie

Programme d'Études Supérieures en Immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

de l'Université de Sherbrooke

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Science (M.Sc.) en immunologie

Avril 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-25963-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-25963-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Table des matières	III
Liste des figures	V
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	V
Résumé	X
Introduction	11
1. Le sepsis	11
1.1. Épidémiologie	13
1.2. Pathogénèse	15
2. Dysfonction myocardique du choc septique	19
2.1. Notions de cardiologie	19
2.2. Détection de la dysfonction myocardique du choc septique	22
2.3. Dysfonction myocardique au cours du sepsis chez l'homme	24
2.3.1. Fonction systolique ventriculaire gauche	24
2.3.2. Fonction diastolique ventriculaire gauche	24
2.4. Mécanisme de la dysfonction myocardique	25
2.4.1. Homéostasie calcique intracellulaire couplage excitation-contraction	26
2.4.2. Facteurs humoraux	27
2.4.2.1. L'endotoxine	27
2.4.2.2. Le tumor necrosis factor- α (TNF- α)	28
2.4.2.3. Le monoxyde d'azote (NO)	29
2.4.2.4. Les leukocytes et chémokines	31

2.4.3. Apoptose	32
3. Le macrophage migration inhibitory factor (MIF)	35
3.1. Structure	36
3.2. Activité enzymatique	39
3.3. Sources cellulaires	40
3.4. Mécanismes moléculaires	42
3.4.1. Récepteur du MIF	42
3.4.2. Influence sur l'expression de TLR4	43
3.4.3. Effets sur l'activité p53	44
3.4.4. Interaction entre MIF et Jab-1	46
3.5. Implication dans l'inflammation	47
3.6. Implication dans la dysfonction myocardique du choc septique.....	49
Manuscrit	51
Discussion	79
Conclusion	89
Remerciements	90
Bibliographie	91

Liste des figures

Figure 1. Cascades intracellulaires induites par les lipopolysaccharides	18
Figure 2. Courbe pression-volume physiologique du ventricule gauche	21
Figure 3. Graphique schématisant l'altération de la contractilité du ventricule gauche ...	23
Figure 4. Points importants de l'histoire du MIF	36
Figure 5. Structure du gène <i>MIF</i> humain	37
Figure 6. Structure homotrimérique du MIF	38
Figure 7. Mode d'action du MIF	45

Liste des tableaux

Tableau 1. Définitions du sepsis selon l'ACCP/SCCM	12
Tableau 2. Fréquence des pathogènes induisant des chocs septiques	15
Tableau 3. Distribution tissulaire et cellulaire du MIF	41

Liste des abréviations

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
ACTH	Hormone adrénocorticotrope (<i>Adrenocorticotropin hormone</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine-5-monophosphate cyclique
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activator factor-1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATPase	Adénosine triphosphatase

CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
CRE	<i>Cyclic AMP-responsive element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
CRF	<i>Corticotrophin-releasing factor</i>
COX2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
DDT	<i>Tautomérase D-dopachrome</i>
DFF40/CAD	<i>DNA fragmentation factor 40/caspase-activated Dnase</i>
DFF45/ICAD	<i>DNA fragmentation factor 45/inhibitor of caspase-activated Dnase</i>
Ecsit	<i>Evolutionarily conserved signalling intermediate in toll pathways</i>
E _{max}	<i>Élastance maximale</i>
ERK1/ERK2	<i>Extracellular signal regulated kinases 1 and 2</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FEVG	<i>Fraction d'éjection ventriculaire gauche</i>
GMP _c	<i>Guanine monophosphate cyclique</i>
I κ B	<i>Inhibitor of nuclear factor-κB</i>
IKK	<i>Inhibitory κB kinase</i>
IFN- γ	<i>Interféron-γ</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISRE	<i>Interferon-stimulated responsive element</i>
Jab-1	<i>JUN-activation domain-binding protein 1</i>
JNK	<i>JUN N-terminal kinase</i>

LPS	Lipopolysaccharide
Mal	<i>MyD88 adaptor-like</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MD2	<i>Myeloid differentiation 2</i>
MEKK	<i>Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MPTP	Pore mitochondriale perméable transitionnelle (<i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
MyD88	<i>Myeloid differentiation protein 88</i>
MyD88s	<i>MyD88 short</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NO	Monoxyde d'azote (<i>nitric oxide</i>)
NOS	NO-synthase
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PDGF-AB	<i>Platelet-derived growth factor-AB</i>
PDK	<i>3-phosphoinositide-dependent kinase</i>
PGE2	Prostaglandine E2
PHA	Phytohémagglutinine
PI	Phosphoinositide
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMA	Phorbol myristate acétate
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>

PTDVG	Pression télédiastolique ventriculaire gauche
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SIGIRR	<i>Single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule</i>
SIRS ou SRIS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> ou syndrome de réponse inflammatoire systémique
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
Sp1	<i>Stimulating protein 1</i>
TANK	<i>TRAF-associated NF-κB kinase</i>
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
T _H 1	<i>T Helper 1</i>
TICAM	<i>TIR-containing adaptor molecule</i>
TIR	<i>Toll-interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	Récepteur Toll-like (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)
Tollip	<i>Toll-interacting protein</i>
TRADD	<i>TNF-R1-associated death domain</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon β</i>
TSST	<i>Toxic shock syndrome toxin-1</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling</i>
VES	Volume d'éjection systolique

VG	Ventricule gauche
VTDVG	Volume télédiastolique ventriculaire gauche
VTSVG	Volume télésystolique ventriculaire gauche

Dysfonction myocardique endotoxinique : effets de la neutralisation du Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF).

Par Frédéric Chagnon

Département de pneumologie, Programme d'études supérieures en immunologie,
Mémoire présenté à la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke en vue de
l'obtention du grade de *Maître ès Sciences* (M.Sc.) en immunologie.
Avril 2006.

Résumé

Les sepsis sévères et chocs septiques constituent des causes croissantes de morbidité et de mortalité chez les patients hospitalisés. La dysfonction cardio-circulatoire lors d'un choc septique s'avère un élément majeur et initial dans l'induction et l'entretien des défaillances organiques subséquentes. En effet, certaines bactéries et endotoxines déclenchent une séquence d'événements cellulaires qui mènent à une altération des performances cardiaques. Le macrophage migration inhibitory factor (MIF) a récemment été identifié en tant que facteur de dépression cardiaque lors de choc septique. Ainsi, la présente étude révèle que la neutralisation du MIF prévient la dysfonction myocardique induite par l'endotoxine dans un modèle expérimental chez le rat. De façon sous-jacente, le blocage du MIF empêche la hausse d'expression et de production dans le coeur de cytokines inflammatoires paracrines et autocrines (IL-1, IL-6 et TNF- α) en réponse au LPS. D'un point de vue mécanistique, cette étude démontre que la neutralisation du MIF inhibe l'apoptose des cardiomyocytes provoquée par l'endotoxine. Ainsi, le présent travail met en évidence un mécanisme précis par lequel le MIF influence la dépression cardiaque endotoxinique. Ce mécanisme implique que le blocage du MIF induit une augmentation du ratio protéique cardiaque de Bcl-2/Bax contribuant ainsi à prévenir le relâchement du cytochrome c mitochondrial induit par l'endotoxine. Cette inhibition de la perte de cytochrome c mitochondrial entraîne une réduction de l'activation de la caspase-3. La neutralisation du MIF rétablit la déficience provoquée par le LPS au niveau de la translocation nucléaire de phospho-Akt et par conséquent l'expression du facteur nucléaire de survie cardiaque GATA-4. Cette baisse d'activité caspase-3 et le rétablissement de la translocation/expression des facteurs de survie par le blocage du MIF résultent en une diminution de la fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose tardive. Globalement, l'inactivation du MIF lors d'un choc endotoxinique prévient le déséquilibre inflammatoire et apoptotique dans le coeur protégeant ainsi contre la dysfonction myocardique subséquente.

Mots clés : sepsis, dysfonction myocardique, MIF, LPS, apoptose.

Introduction

1. Le sepsis

L'évolution a mené à un consortium de relations et d'interactions complexes entre les humains et les bactéries. En fait, l'être humain est constitué de 10^{12} cellules humaines et il est peuplé par 10^{14} bactéries d'espèces multiples. Il existe peu de notions à propos des mécanismes d'immunité innée et acquise qui maintiennent cet état d'équilibre symbiotique. D'un point de vue infectieux, les maladies d'origine bactérienne naissent d'une rupture dans cet état d'équilibre. Les réponses innées et adaptatrices du système immunitaire face à ces transgressions peuvent entraîner des conséquences désastreuses allant même jusqu'au décès. Le sepsis constitue l'une de ces réponses inflammatoires inadéquates face à une infection microbienne systémique. Dès 1927, Gastinel et Reilly (GASTINEL et REILLY, 1948) définissent l'état septicémique comme « toute infection générale conditionnée par des décharges massives et répétées dans le sang de bactéries pathogènes et de leurs poisons. Issue d'un foyer septique, appréciable ou non, cette migration de germes, continue ou discontinue, engendre des signes généraux graves tenant à de multiples embolies microbiennes, à l'action des toxines bactériennes, enfin aux effets nocifs des produits de dégradation cellulaire, tous symptômes laissant au deuxième plan le foyer infectieux initial ». Par la suite, le terme « sepsis » a été utilisé pendant plusieurs années de manière interchangeable avec d'autres expressions telles que « bactériémie », « sepsis sévère » et même « choc septique ». Ce désordre terminologique a terni la plupart des études publiées avant l'adoption du consensus de 1992 par l'ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine) (SIBBALD *et al.*, 1991).

Le consensus a défini précisément les symptômes cliniques associés à chaque stade de la réponse inflammatoire dans le cadre de la septicémie (tableau 1) (BONE *et al.*, 1992). Ainsi, l'expression anglaise *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)* représente les réactions inflammatoires systémiques face à une blessure ou un stress (pancréatites ou traumatismes sévères). Lorsque le *SIRS* est associé à la présence anormale de micro-organismes (bactéries, parasites, virus, champignons), il s'agit alors d'un sepsis. Le sepsis est donc officiellement définie comme une infection avec des évidences d'inflammation systémique comportant au moins deux des symptômes suivants : une augmentation ou une baisse de la température corporelle, une altération des taux de leucocytes, de la tachycardie ou de l'hyperventilation. Le sepsis peut dégénérer en sepsis sévère principalement caractérisé par la dysfonction d'au moins un organe. Finalement, le processus inflammatoire peut culminer en choc septique qui s'avère en fait un sepsis sévère avec une hypotension persistante (dysfonction cardio-circulatoire) malgré un apport externe de fluides intraveineux et/ou de drogues vaso-actives (BONE *et al.*, 1992).

<i>SIRS</i> ou <i>SRIS</i>	Au moins 2 des anomalies suivantes : <ul style="list-style-type: none"> - température > 38 °C ou < 36 °C - fréquence cardiaque > 90/min - fréquence respiratoire > 20/min ou Pa CO₂ < 32 mmHg - leucocytose > 12 000/mm³ ou < 4 000/mm³ ou > 10 % de cellules immatures
Sepsis	<i>SIRS</i> associé à une infection documentée
Sepsis sévère	Sepsis et dysfonction d'au moins un organe : Hypotension (tension artérielle systolique < 90 mmHg ou réduction d'au moins 40 mmHg des chiffres habituels en l'absence d'autre cause d'hypotension), acidose lactique, oligurie, encéphalopathie aiguë, hypoxémie inexpliquée, coagulopathie
Choc septique	Sepsis sévère et hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat et/ou nécessité de drogues inotropes ou vaso-actives

Tableau 1. Définitions du sepsis selon l'ACCP/SCCM (BONE *et al.*, 1992).

1.1 Épidémiologie de l'infection

À priori, la classification proposée par l'ACCP/SCCM prévient la confusion terminologique entourant les états septicémiques, par contre elle entraîne un problème majeur au niveau des études épidémiologiques. C'est-à-dire que la pratique médicale ne permet pas nécessairement de documenter une infection chez tous les patients présentant un ou plusieurs critères des syndromes septiques (50 % des cas) (REYES *et al.*, 1999). Ainsi, ces patients doivent être exclus des études épidémiologiques dans le cadre du sepsis. L'inverse est également vrai en ce qui concerne les patients avec une infection documentée, mais qui ne correspondent pas exactement au profil de l'un des syndromes septiques.

Malgré la mise en pratique difficile de cette classification stricte, plusieurs études révèlent des statistiques démontrant une incidence élevée et croissante des différents états septicémiques (ANGUS *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2003). En effet, bien que les conditions de vie et d'hygiène se soient améliorées, les infections sévères demeurent un véritable problème de santé publique (ANGUS *et al.*, 2001). Le sepsis sévère constitue une pathologie fréquente (1 % des hospitalisations aux États-Unis) et grave, responsable de 150 000 décès par an aux États-Unis, soit autant que le nombre de morts par maladies cardiovasculaires (ANGUS *et al.*, 2001). Le choc septique, la forme clinique la plus sérieuse des états infectieux, représente la première cause de décès en réanimation. Il conserve un taux de mortalité très élevé (40 à 70 %) malgré le développement de techniques d'assistance sophistiquées, l'existence d'antibiotiques puissants et de nouveaux traitements issus des progrès dans la connaissance de sa physiopathologie (BERNARD *et al.*, 2001; VEINSTEIN *et al.*, 2001).

Bien que les différentes études présentent une certaine variabilité d'incidence en fonction des pays, l'origine des foyers infectieux demeure similaire d'une étude à l'autre (KIEFT *et al.*, 1993; BRUN-BUISSON *et al.*, 1995; PITTET *et al.*, 1995; RANGEL-FRAUSTO *et al.*, 1995; SANDS *et al.*, 1997; REYES *et al.*, 1999; PONCE DE LEON-ROSALES *et al.*, 2000; ALBERTI *et al.*, 2002; BRUN-BUISSON *et al.*, 2004). Ainsi, les infections respiratoires et urinaires sont le plus souvent reliées au sepsis. Cependant, la proportion d'infection urinaires décroît avec la sévérité du sepsis. Dans le même ordre d'idées, l'infection intra-abdominale est responsable de 20 % des sepsis sévères et des chocs septiques, alors qu'elle est rarement à l'origine des sepsis simples. D'autre part, les patients souffrants d'un choc septique d'origine indéterminée ou multifocale ont généralement un pronostic plus grave (REYES *et al.*, 1999).

De nombreux facteurs peuvent influencer le devenir d'un processus infectieux : virulence de l'agent pathogène, traitement tardif, antibiothérapie inadaptée, immunodéficiences de l'hôte (cancer, traitement immunosuppresseur, SIDA) (BION, 2000; ALBERTI *et al.*, 2002; ANNANE *et al.*, 2003; MARTIN *et al.*, 2003). Certaines études ont également mis en évidence le rôle protecteur ou délétère des variabilités génétiques de l'hôte qui modifient ses capacités à se défendre et influencent ainsi la formation et/ou la progression des infections (SORENSEN *et al.*, 1988; HILL, 1998; LIN et ALBERTSON, 2004).

L'identification des micro-organismes impliqués dans les chocs septiques a permis d'observer au cours des dernières années une prévalence croissante des organismes à Gram + (30-50 % des cas) et un déclin de la fréquence des sepsis de type Gram – (25-30 %) (tableau 2) (ALBERTI *et al.*, 2002; ANNANE *et al.*, 2003; MARTIN *et al.*, 2003). En

majeure partie, ce phénomène provient de l'utilisation plus courante de cathéters et de corps étrangers intravasculaires.

	Estimated frequency ^a
Gram-positive bacteria	30-50%
Meticillin-susceptible <i>Staphylococcus</i>	14-24%
Meticillin-resistant <i>Staphylococcus</i>	5-11%
Other <i>Staphylococcus</i> spp	1-3%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9-12%
Other <i>Streptococcus</i> spp	6-11%
<i>Enterococcus</i> spp	3-13%
Anaerobes	1-2%
Other gram-positive bacteria	1-5%
Gram-negative bacteria	25-30%
<i>E. coli</i>	9-27%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8-15%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2-7%
Other <i>Enterobacter</i> spp	6-16%
<i>Haemophilus influenzae</i>	2-10%
Anaerobes	3-7%
Other gram-negative bacteria	3-12%
Fungi	
<i>Candida albicans</i>	1-3%
Other <i>Candida</i> spp	1-2%
Yeast	1%
Parasites	1-3%
Viruses	2-4%

^aFrom published clinical trials^{10,11} and epidemiological studies.¹²

Table 1: Main pathogens in septic shock

Tableau 2. Fréquence des pathogènes induisant des chocs septiques. Tableau tiré de (ANNANE *et al.*, 2005).

1.2 Pathogénèse

L'infection résulte de la capacité des pathogènes à coloniser les surfaces cutanées ou muqueuses de l'hôte, voire même de l'envahir à un niveau local ou systémique. L'infection, au sens restreint, peut entraîner des lésions provoquées par l'invasion des tissus et la production de toxines. Par contre, les symptômes observés en réaction à cette infection proviennent essentiellement de la réponse immunitaire de l'hôte face à la présence du pathogène infectieux. Il s'agit en fait de la réponse innée principalement caractérisée par l'inflammation engendrée par un signal de danger. D'ailleurs, Poly

Matzinger (MATZINGER, 1994) révolutionna la définition de l'immunologie, en préconisant que le système immunitaire était, non pas en place pour discriminer le soi du non soi, mais pour reconnaître et réagir face aux signaux de danger interne. Ces signaux de danger correspondent à des molécules exogènes ayant des patrons moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Ces derniers consistent souvent en des molécules de surface telles que les endotoxines (lipopolysaccharides), lipoprotéines, acides lipotéichoïques, peptidoglycanes et autres protéines de la paroi externe ; ou des motifs internes relâchés lors de la lyse bactérienne tels que les protéines de chocs thermiques et les fragments d'ADN. Ces patrons moléculaires sont reconnus par des récepteurs spécifiques (*pattern recognition receptors*, PRRs) qui vont induire l'activation de différentes cascades intracellulaires entraînant ainsi l'expression de molécules effectrices telles que des cytokines, chemokines et des molécules d'adhésion impliquées dans l'inflammation. Jusqu'à récemment, ce processus inflammatoire était uniquement décrit au niveau des cellules immunitaires, mais son existence est maintenant démontré dans plusieurs tissus où son activation joue un rôle significatif dans la pathogénèse du sepsis.

Les récepteurs spécifiques PRRs comptent parmi leurs membres le CD14 et les *toll-like receptors* (TLRs). Le CD14 est une protéine membranaire de 55 kd ancrée au niveau des glycosylphosphatidylinositol et il est en mesure de lier les lipopolysaccharides (LPS) avec une forte affinité. Il s'avère grandement impliqué dans les réponses envers le LPS tel que démontré par l'hypersensibilité aux lipopolysaccharides chez des souris surexprimant le CD14 (FERRERO *et al.*, 1993). De façon subséquente, les souris déficientes en CD14 sont 10 000 fois moins sensibles au LPS que les souris normales et elles semblent être protégées contre les chocs septiques induits par le LPS (HAZIOT *et*

al., 1996). Par contre, le mécanisme de signalisation de CD14 est demeuré longtemps une énigme étant donné l'absence de domaine transmembranaire.

La découverte des TLRs a permis une meilleure compréhension des événements précoces constituant la reconnaissance microbienne. Medzhitov *et al* (MEDZHITOV *et al.*, 1997) a caractérisé le premier homologue humain d'un Toll de drosophile (TLR4). Actuellement, dix récepteurs toll-like ont été découverts chez l'humain et la liste de leur ligands microbiens continue de croître (YAMAMOTO *et al.*, 2004). Le TLR4 est reconnu pour activer le facteur nucléaire NF- κ B et induire l'expression de cytokines proinflammatoires en réponse au LPS. D'ailleurs, Poltorak (POLTORAK *et al.*, 1998) et Qureshi (QURESHI *et al.*, 1999) ont été les premiers à démontrer que l'hyposensibilité au LPS de deux lignées de souris (C3H/HeJ et C57BL/10ScCr) était liée à une défaillance au niveau du gène *Tlr4*. Des mutations ciblées vers le gène *Tlr4* ont par la suite confirmé cette association en rendant des souris normales résistantes au LPS (HOSHINO *et al.*, 1999). Ces études présentent donc un lien entre la liaison du LPS au CD14 et la signalisation transmembranaire via TLR4.

L'interaction des TLRs avec leurs ligands microbiens entraîne l'activation de multiples voies de signalisations intracellulaires (figure 1). La voie d'activation de NF- κ B s'avère l'une des mieux caractérisée. Brièvement, la liaison du LPS au CD14 mène à l'homodimérisation des TLR4s, ce qui entraîne un changement conformationnel dans leur domaine cytoplasmique *toll-interleukin-1 receptor* (TIR) permettant ainsi le recrutement de la protéine adaptatrice *myeloid differentiation protein* [MyD] 88 (CAO *et al.*, 1996; MUZIO *et al.*, 1997; WESCHE *et al.*, 1997). MyD88 consiste en un domaine C-terminal qui s'associe au TLR via le module cytoplasmique TIR et une portion N-terminale appelée domaine de mort. Le domaine de mort de MyD88 recrute *IL-1 receptor-associated kinase*

(IRAK) provoquant ainsi son autophosphorylation. IRAK se dissocie ensuite du complexe et recrute *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) qui va activer la cascade de kinases en aval. Finalement, *NF- κ B-inducing kinase* (NIK) active le complexe *inhibitory κ B kinase* (IKK) qui est en mesure de phosphoryler directement I κ B α permettant ainsi la translocation nucléaire de NF- κ B et l'initiation de la transcription de gènes (MUZIO *et al.*, 1997; MUZIO *et al.*, 1998). La suractivation de NF- κ B induite par les produits microbiens (PAMPs) peut entraîner une production excessive de médiateurs proinflammatoires provoquant ainsi des dommages tissulaires et des défaillances multiorganiques.

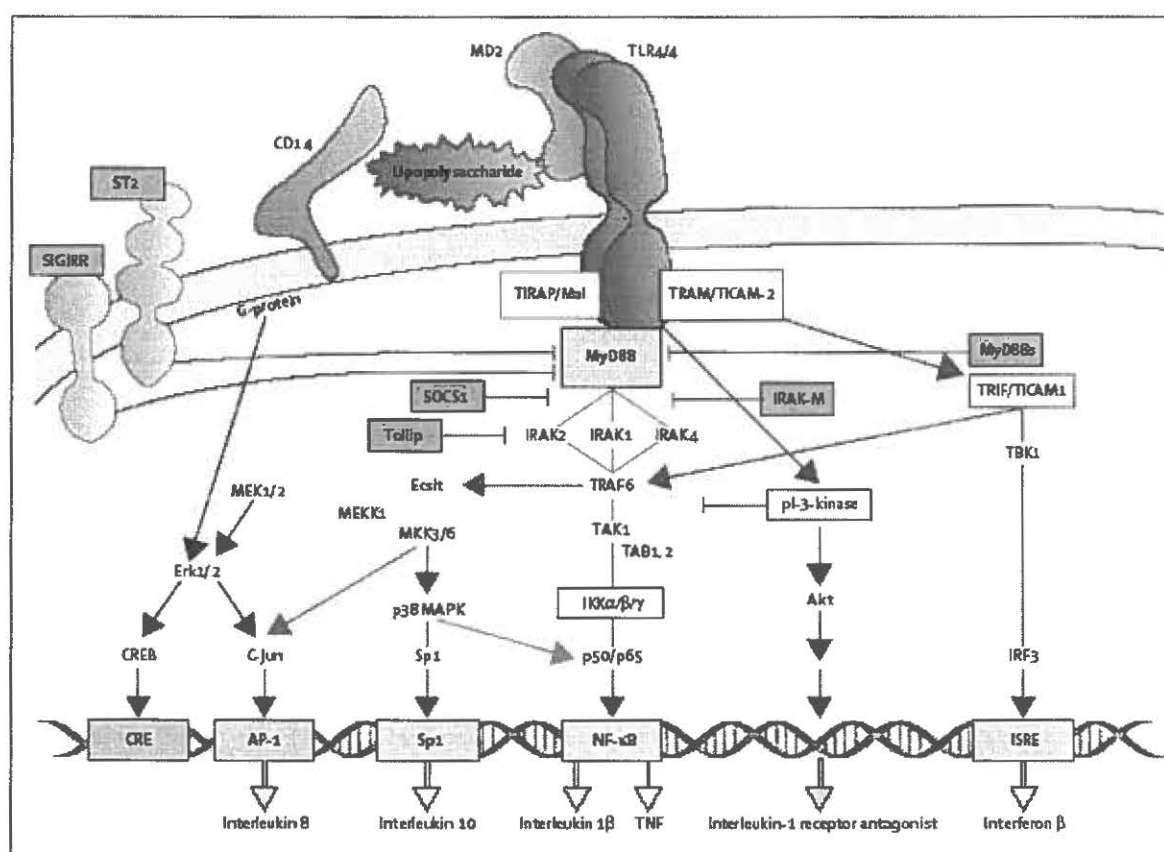


Figure 1. Cascades intracellulaires induites par les lipopolysaccharides. CRE : *cyclic AMP-responsive element* ; CREB : *CRE binding protein* ; Ecsit : *evolutionarily conserved*

signalling intermediate in toll pathways ; MD2 : *myeloid differentiation 2* ; AP-1 : *activator protein-1* ; Erk : *extracellular signal-regulated kinase* ; IKK2 : *I kappa B kinase2* ; IRF : *interferon regulatory factor* ; ISRE : *interferon-stimulated responsive element* ; IRAK : *interleukin-1 receptor-associated kinase* ; MAPK : *mitogen-activated protein kinase* ; MEKK : *mitogen-activated protein kinase/ERK kinase* ; MyD88 : *myeloid differentiation protein 88* ; Mal : *MyD88 adaptor-like* ; MyD88s : *MyD88 short* ; NF- κ B : *nuclear factor- κ B* ; pI : *phosphoinositide* ; SIGIRR : *single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule* ; Sp1 : *stimulating protein 1* ; SOCS : *suppressor of cytokine signalling* ; TANK : *TRAF-associated NF- κ B kinase* ; TBK : *TANK-binding kinase* ; TRIF : *TIR (toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor protein inducing interferon β* ; TICAM : *TIR-containing adaptor molecule* ; TIRAP : *TIR domain-containing adaptor protein* ; Tollip : *toll-interacting protein* ; TLR : *toll-like receptor* ; TRAF : *tumor necrosis factor receptor-associated factor* ; TRAM : *TRIF-related adaptor molecule*. Figure tirée de (ANNANE *et al.*, 2005).

2. Dysfonction myocardique du choc septique

La dysfonction cardio-circulatoire lors d'un choc septique constitue un élément majeur et initial dans l'induction et l'entretien des défaillances organiques subséquentes. Elle survient dans 40 % des cas de sepsis et fait passer la mortalité de 20-30 % dans le sepsis sans dysfonction cardiovasculaire à 40-70 % dans le choc septique (ANGUS *et al.*, 2001).

2.1 Notions de cardiologie

Le tableau hémodynamique observé au cours du choc septique s'avère relativement complexe et sa compréhension requiert plusieurs notions de cardiologie. Ces notions seront donc abordées dans un premier temps avant d'élaborer sur la physiopathologie cardiaque lors du sepsis. Les propos se limiteront à l'atteinte du myocarde ventriculaire gauche, car la contribution relative de la dépression ventriculaire droite dans le sepsis demeure largement inconnue (KIMCHI *et al.*, 1984; PARKER *et al.*, 1990). Le ventricule gauche (VG) est donc un muscle qui a la capacité de se contracter (fonction systolique) et de se relaxer (fonction diastolique). De façon synergique avec le système de valves et le péricarde, il joue le rôle d'une pompe qui est responsable du débit cardiaque et assure ainsi les apports systémiques vers les organes. Le débit ventriculaire gauche correspond à la multiplication du volume d'éjection systolique (VES) par la fréquence cardiaque. Celle-ci est sous le contrôle du système nerveux autonome, alors que le VES dépend de la contractilité et des conditions de pré- et de post-charge du ventricule gauche. La pré-charge est définie par le degré d'étirement des sarcomères des myocytes alors que la post-charge représente l'ensemble des contraintes mécaniques qui s'opposent à l'éjection ventriculaire gauche (résistance vasculaire). De façon schématique, la courbe pression-volume intraventriculaire gauche met en évidence les liens entre ces diverses composantes (figure 2). Dans ce graphique, le cycle cardiaque est illustré par une boucle qui se lit dans le sens anti-horaire et se délimite par quatre variables qui représentent les conditions en télédiastole (A-B), en protosystole (B-C), en télésystole (C-D) et en protodiastole (D-A). Ainsi, entre les variables A et B a lieu la phase de contraction suivie par l'éjection ventriculaire (B-C). Il se produit ensuite la phase de relaxation (C-D) qui mène à l'ouverture de la valve mitrale (D) permettant par conséquent le remplissage ventriculaire (D-A). L'aire de la boucle, délimitée par ces quatre points, définit le travail

effectué par le ventricule gauche. La soustraction du volume télésystolique ventriculaire gauche (VTSVG) au volume télédiastolique (VTDVG) permet d'obtenir le volume d'éjection systolique (VES). Le point télédiastolique (A) matérialise la stabilité entre le degré de relâchement des cardiomyocytes et la pression vasculaire qui ramène le sang dans le ventricule avant la contraction. Le point télésystolique (C) illustre l'équilibre entre les résistances vasculaires (post-charge) et les forces sarcomériques précédant la relaxation. À partir du point télésystolique, il est possible de tracer une droite représentant la relation pression-volume télésystolique du ventricule gauche. La pente de cette droite, désignée élastance ventriculaire maximale (E_{\max}), constitue un indice de contractilité ventriculaire fiable.

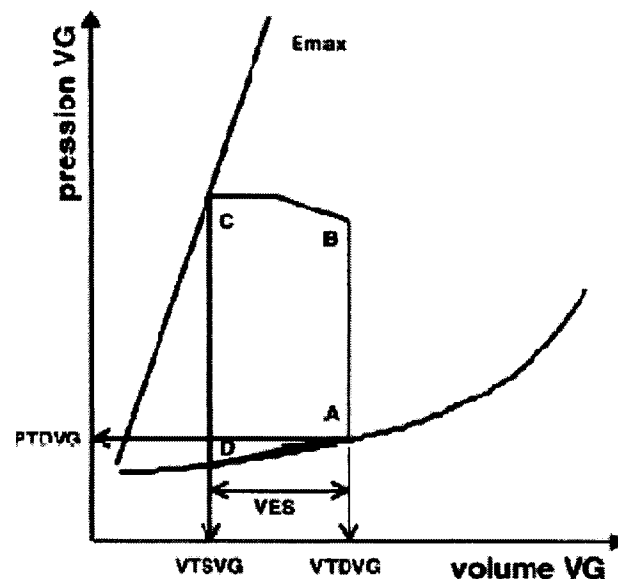


Figure 2. Courbe pression-volume physiologique du ventricule gauche. VTSVG : volume télésystolique VG ; VTDVG : volume télédiastolique ; PTDVG : pression télédiastolique VG ; VES : volume d'éjection systolique ; E_{\max} : élastance ventriculaire.

2.2 Détection de la dysfonction myocardique du sepsis

L'intégrité de la méthode de détection utilisée s'avère primordiale, car les anomalies circulatoires périphériques du choc septique (vasodilatation, hypotension artérielle, hypovolémie reliée à la fuite capillaire) complique la mise en évidence d'une dysfonction myocardique (GROCOTT-MASON et SHAH, 1998). En effet, la tachycardie et la réduction de post-charge (effondrement des résistances vasculaires périphériques) lors du choc septique vont favoriser l'augmentation du débit cardiaque alors que l'hypovolémie va plutôt engendrer sa réduction. L'effet total résulte en un débit cardiaque normal, bien que cette normalité ne représente pas nécessairement des fonctions ventriculaires adéquates (PARKER *et al.*, 1987). Par conséquent, le débit est loin de constituer l'indice de contractilité ventriculaire idéal dans le cas du sepsis.

La relation pression-volume télésystolique de la boucle est donc le meilleur reflet de la fonction ventriculaire puisqu'elle fait abstraction de la pré-charge et considère les conditions de post-charge. Ainsi, des modèles expérimentaux et des cas cliniques de choc septique ont montré un déplacement vers le bas et la droite de la pente (E_{\max}) de cette relation pression-volume télésystolique (figure 3) (NATANSON *et al.*, 1988; POELAERT *et al.*, 1997; JARDIN *et al.*, 1999). La baisse de E_{\max} se traduit par une augmentation du volume télésystolique entraînant une réduction du volume d'éjection malgré la hausse du volume télédiastolique (dilatation ventriculaire). Cette diminution de l'élastance maximale observé au cours du choc septique suggère une perte de la contractilité myocardique indépendante des conditions de remplissage (hypovolémie). D'ailleurs, de nombreux modèles expérimentaux sont fondés sur les performances *ex vivo* de coeurs isolés (modèle de Langerdorf) puis perfusés de préparations bactériennes ou d'endotoxines

(NATANSON *et al.*, 1988). Ces modèles excluent les anomalies circulatoires périphériques et par conséquent les variations de volume puisque la quantité de fluide en circulation demeure fixe. Or, les modèles *ex vivo* (conditions de remplissage normales) démontrent donc une altération directe des propriétés contractiles (baisse de E_{\max}) induite par les bactéries ou les endotoxines. Cependant, les travaux de Pinsky *et al* (PINSKY et RICO, 2000) démentent la perte de contractilité ventriculaire dans un modèle endotoxinique canin laissant présager des divergences entre les espèces.

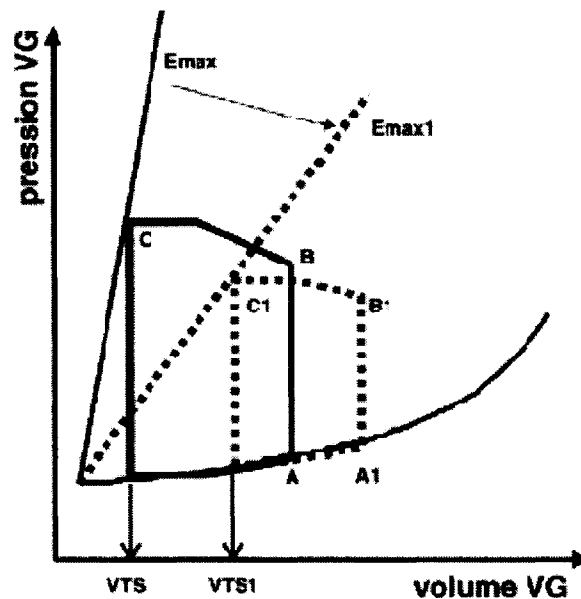


Figure 3. Graphique schématisant l'altération de la contractilité du ventricule gauche. L'altération de la contractilité du ventricule gauche se traduit par une diminution de la pente de E_{\max} . Le volume d'éjection systolique ($A1 - VTS1$) est diminué malgré la hausse du volume télédiastolique (déplacement du point $A1$ vers la droite).

2.3 Dysfonction myocardique au cours du sepsis chez l'homme

Le tableau hémodynamique observé au cours du choc septique est initialement caractérisé par un débit cardiaque normal ou élevé qui peut évoluer vers une défaillance myocardique impliquant la systole et la diastole. La dysfonction cardiaque atteint généralement son apogée pendant les 24 premières heures du sepsis. Chez les survivants, on observe une réversion totale 7 à 10 jours après le début de l'infection alors que la fonction ventriculaire gauche ne cesse de se détériorer chez les non-survivants (PARKER *et al.*, 1984).

2.3.1 Fonction systolique ventriculaire gauche

Le débit cardiaque normal ou élevé masque souvent la chute des performances du ventricule occasionnée par l'hypotension persistante et la baisse du volume éjecté à chaque contraction (diminution du VES). En dépit de cet obstacle, plusieurs études ont néanmoins démontré une altération de certains indices du travail systolique chez des patients en choc septique (PARKER *et al.*, 1987; OGNIBENE *et al.*, 1988). Cette défaillance systolique du ventricule gauche a de surcroît été confirmée chez des volontaires sains soumis à des injections d'endotoxine (SUFFREDINI *et al.*, 1989).

2.3.2 Fonction diastolique ventriculaire gauche

La dysfonction diastolique ventriculaire gauche n'est pas aussi bien définie au niveau du sepsis. La dilatation du ventricule gauche (augmentation du VTDVG) serait responsable du maintien ou de l'augmentation du débit décrit chez les patients septiques. Ce phénomène constituerait un mécanisme compensateur afin de maintenir un débit

cardiaque adéquat malgré la vasodilatation et le syndrome de fuite capillaire (PARKER *et al.*, 1984; NATANSON *et al.*, 1988; TAVERNIER *et al.*, 1998). La dilatation ventriculaire demeure néanmoins controversée et même niée par certaines études récentes (POELAERT *et al.*, 1997). L'existence d'une dysfonction diastolique apparaît toutefois probable à la lumière des récentes études échocardiographiques qui démontrent un ralentissement au niveau du remplissage ventriculaire gauche (JAFRI *et al.*, 1990) et une phase de relaxation aberrante (POELAERT *et al.*, 1997; MUNT *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent ainsi qu'une altération de la compliance cardiaque (capacité de remplissage ventriculaire) contribuerait à la dépression myocardique dans le sepsis.

2.4 Mécanismes de la dysfonction myocardique

Les mécanismes physiopathologiques de la dysfonction myocardique associée à une infection grave telle que le sepsis sont encore largement débattus. De nombreuses hypothèses ont été proposées faisant intervenir des facteurs circulants ou produits localement lors du processus infectieux, l'activation leucocytaire et endothéliale, des phénomènes apoptotiques myocardiques et des altérations structurales du muscle cardiaque. La persistance *ex vivo* d'anomalies de la contractilité du tissu cardiaque septique témoigne de l'existence d'altérations cellulaires durables (PARKER *et al.*, 1984; PARKER *et al.*, 1990). Parmi les mécanismes cellulaires impliqués, les modifications de la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire et de la sensibilité des myofilaments au calcium sont déterminants.

2.4.1 Homéostasie calcique intracellulaire et couplage excitation-contraction

Physiologiquement, la dépolarisation de la membrane sarcolemmique entraîne l'ouverture des canaux calciques lents : l'augmentation locale de Ca^{2+} intracellulaire découlant de l'afflux calcique trans-sarcolemmique active les récepteurs à la ryanodine du réticulum endoplasmique ce qui conduit au relargage massif du Ca^{2+} du réticulum vers le cytosol. Le Ca^{2+} libéré se fixe sur la troponine C (membre du complexe des troponines C, T et I) entraînant ainsi une modification conformationnelle au niveau du complexe troponine-tropomyosine qui va permettre l'interaction actine-myosine.

L'endotoxine modifie les caractéristiques du potentiel d'action des cardiomyocytes en réduisant le nombre et la densité des canaux calciques au niveau du sarcolemme (LIU et GHOSH, 1986). Les phénomènes de libération / captation du réticulum endoplasmique sont également altérés dans des préparations de myocytes isolés et exposés au LPS. De plus, une réduction d'activité de l'échangeur Na - Ca^{2+} et de la Ca^{2+} ATPase du sarcolemme est observé dans des modèles similaires. Les fonctions sarcolemmiques et du réticulum endoplasmique sont ainsi profondément modifiées et peuvent diminuer la contractilité du cardiomyocyte (LIU, 1990; LIU et WU, 1992; WU et LIU, 1992).

Certaines études, réalisées sur des cardiomyocytes septiques, suggèrent aussi l'existence d'une diminution de la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} et/ou de la force maximale induite par le Ca^{2+} . *In vitro*, le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) (à forte concentration) et l'endotoxine réduisent la réponse des myofilaments face au Ca^{2+} par des phénomènes de phosphorylation des protéines contractiles (TAVERNIER *et al.*, 2001).

2.4.2 Facteurs humoraux

Plusieurs travaux expérimentaux et cliniques ont suggéré l'existence d'un facteur circulant déprimant la contractilité ventriculaire au cours du sepsis. L'exposition de préparations musculaires cardiaques à des sérums de patients en état de choc septique altèrent leur fraction de raccourcissement (PARRILLO *et al.*, 1985). La nature exacte de cette molécule n'a pu être déterminée avec certitude bien que de nombreux médiateurs de la réponse infectieuse ont été suspectés :

2.4.2.1 L'endotoxine

L'endotoxine exerce des effets directes et indirectes sur le myocarde (SUFFREDINI *et al.*, 1989; SUGI *et al.*, 1991). La contractilité normale dépend du maintien de gradients ioniques au niveau des pompes ATP-dépendantes. L'endotoxine modifie l'activité de ces pompes avec, en particulier, une réduction de la quantité d'ATP, une diminution de l'activité de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase et une inhibition du relargage de calcium du sarcolemme et du réticulum sarcoplasmique. Cette action directe et immédiate de l'endotoxine sur des préparations de tissus cardiaques a été décrite pour des doses très importantes et probablement sans pertinence physiopathologique (TAO et MCKENNA, 1994). Ainsi, la réduction de contractilité myocardique semble surtout liée à une action indirecte secondaire à la libération de médiateurs inflammatoires tels que $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 et IL-6 (PAGANI *et al.*, 1992).

2.4.2.2 Le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α)

Le TNF- α apparaît comme un puissant facteur de dépression myocardique du choc septique expérimental et humain (HEARD *et al.*, 1992; PAGANI *et al.*, 1992). L'administration d'anticorps neutralisants le TNF- α permet de réduire considérablement la dysfonction myocardique endotoxinique dans des modèles animaux (TRACEY *et al.*, 1987) contrairement aux thérapies anti-TNF- α chez l'humain qui ont échouées lamentablement (ABRAHAM, 1999). Il a été démontré que le TNF- α exerce ses effets inotropes négatifs par des mécanismes dépendants et indépendants de la production de monoxyde d'azote (NO). En effet, la dépression myocardique induite par le TNF- α (également IL-1 β et IL-6) est entièrement prévenue par l'inhibition de synthèse de NO *in vitro* sur muscles papillaires ou myocytes isolés mais seulement de manière partielle *in vivo* (FINKEL *et al.*, 1992).

À l'échelon cellulaire, le TNF- α , synthétisé par les cellules mononuclées résidentes et les myocytes, se lie à des récepteurs membranaires TNF-R1 et -R2. La liaison à ces récepteurs s'accompagne de la formation de complexes moléculaires (*TNF-associated factors*, TRAFs) permettant la translocation nucléaire de NF- κ B (MELDRUM, 1998; NEVIERE *et al.*, 1999). Parmi les conséquences de l'oligomérisation de TNF-R2, la translocation nucléaire de NF- κ B représente un événement déterminant étant donné qu'elle permet la transcription de gènes (TNF- α , IL-1, IL-6, sélectines, facteur tissulaire, NO-synthases inductibles). De plus, le TNF- α se lie au récepteur TNF-R1 pour permettre une interaction des complexes protéiques TRADD (*TNF-R1-associated death domain*) / FADD (*Fas-associated death domain*) qui participent à des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire programmée (cf ci-après).

Les effets précoces du TNF- α sur le myocarde semblent étroitement liés à ses effets sur l'homéostasie calcique intramyocytaire. In vitro, le TNF- α entraîne une réduction rapide de la contractilité des cardiomyocytes isolés via la chute de la concentration intracellulaire de calcium. Cet effet précoce sur le calcium est indépendant de la production de NO. Dans ce contexte, l'activation d'une sphingomyélinase catalisant l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide semble l'élément déterminant. La dégradation de céramide en sphingosine phosphate diminue l'amplitude de la fraction de raccourcissement et modifie les courants calciques trans-sarcolemmiques des myocytes cardiaques isolés (ORAL *et al.*, 1997). L'augmentation intracellulaire de céramides constitue également un puissant facteur pro-apoptotique (KROWN *et al.*, 1996). Les effets plus tardifs du TNF- α sur le myocarde sont habituellement liés aux effets d'une augmentation de production de NO (TAVERNIER *et al.*, 2001).

2.4.2.3 Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote joue un rôle important dans la dysfonction myocardique liée au sepsis. Le NO consiste en un radical libre produit par des enzymes appelées NO-synthase (NOS), dont on connaît actuellement 3 isoformes: NOS-1 et NOS-3, initialement identifiées dans les cellules endothéliales des gros vaisseaux, on les retrouve finalement dans de nombreux types cellulaires et elles constituent des isoformes dépendantes du calcium et de la calmoduline. NOS-2 est insensible au calcium et elle s'avère inductible notamment sous l'effet de différentes cytokines inflammatoires.

L'induction de NOS-2 observée au cours du choc septique est responsable de la production importante de NO qui explique en grande partie les manifestations vasculaires

périphériques (vasodilatation et hypotension). Les effets directs du NO sur le myocarde sont cependant moins bien établis (KELLY *et al.*, 1996). Physiologiquement, NOS-3 est présente de façon constitutive dans l'endothélium coronaire et elle produit de petites quantités de NO au niveau du myocarde. Le NO exercerait des effets paracrines facilitant la relaxation des myofilaments et la compliance myocardique mais aurait peu d'impacts directs sur les capacités contractiles (PAULUS *et al.*, 1995). En fait, la plupart des effets myocardiques du NO sont liés à l'activation de la guanylate-cyclase soluble, responsable de la production de guanine monophosphate cyclique (GMPc) qui diminue la réponse contractile des myofilaments au calcium cytosolique. Effectivement, le GMPc serait en mesure de stimuler certaines phosphodiesterases responsables de la dégradation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Cette perte d'AMPc intracellulaire expliquerait la diminution de contractilité induite par le NO. Lors d'un choc septique, l'induction de NOS-2 via différentes cytokines ou endotoxine est à l'origine d'une production considérable de NO. Par conséquent, certains associent la synthèse excessive de NO à la dysfonction myocardique subséquente. Ainsi, l'incubation de cardiomyocytes en présence d'endotoxine provoque une réduction de contraction NO-GMPc-dépendant (TAO et MCKENNA, 1994). Bien que cette diminution de contractilité cellulaire peut être attribuée à une augmentation de production de NO dans certaines conditions expérimentales, la réversibilité ou la prévention de la dysfonction cellulaire cardiaque (*ex vivo et in vivo*) en présence d'inhibiteurs de NO synthase est particulièrement variable (WEYRICH *et al.*, 1994). De plus, il est important de mentionner que peu d'équipes ont montré la présence de NOS-2 dans le coeur humain septique (MEBAZAA *et al.*, 2001) et lorsqu'elle est présente, cette protéine est sous forme nitrotyrosylée donc peu fonctionnelle.

À l'instar de ses actions controversées via le GMPc, le NO ou son dérivé le peroxynitrite (ONOO⁻) pourraient nuire au processus de respiration mitochondriale (BROWN, 1999). Le NO inhibe de manière réversible la cytochrome oxydase par compétition avec l'oxygène, alors que le peroxynitrite bloque de manière irréversible la chaîne respiratoire. En fait, une étude chez 28 patients septiques a établi corrélation entre la dysfonction mitochondriale et l'hyperproduction de NO (BREALEY *et al.*, 2002). Le NO et le peroxynitrite sont par ailleurs impliqués directement dans les phénomènes de diminution de rendement cardiaque; c'est-à-dire une altération du couplage entre la production d'ATP et le travail myocardique. Ce processus serait causé par l'atteinte du système de la créatine kinase myocytaire, enzyme clef du métabolisme énergétique du myocyte (TAVERNIER *et al.*, 2001).

2.4.2.4 Les leucocytes et chémokines

Les leucocytes et chémokines peuvent participer à la persistance de la dysfonction myocardique du choc septique après l'action précoce de cytokines pro-inflammatoires (GODDARD *et al.*, 1995). Suite à une stimulation adéquate, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales sont responsables de la synthèse de chémokines (FERDINANDY *et al.*, 2000). Ces chémokines exercent un puissant chimiotactisme sur les leucocytes qui vont s'accumuler dans la microcirculation coronaire. En plus de leur effet direct d'obstruction vasculaire, les leucocytes activés sont responsables de la synthèse de nombreux médiateurs cardiotoxiques. De plus, il est vraisemblable que le recrutement leucocytaire soit responsable de lésions myocardiques telles que oedème interstitiel et nécrose fibrillaire. D'ailleurs, certains travaux expérimentaux montrent que la prévention

de l'infiltration leucocytaire dans le myocarde septique est associée à une amélioration significative des paramètres fonctionnels ventriculaires (GRANTON *et al.*, 1997; NEVIERE *et al.*, 2000).

2.4.4 Apoptose

L'Apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle important dans la régulation physiologique de la maturation, de la prolifération des cellules immunitaires, mais participe également à la dysfonction d'organe. À l'origine, l'apoptose fut définie en tant que mort cellulaire énergie-dépendante caractérisée par des phases distinctes de changements morphologiques ultrastructuraux, soit la condensation de la chromatine nucléaire, rétrécissement cellulaire, fragmentation du noyau (caryorrhexis), bourgeonnement cellulaire puis la formation de corps apoptotiques qui sont rapidement phagocytés par les cellules voisines (BORGERS *et al.*, 2000). L'apoptose se distingue des autres morts cellulaires qui sont typiquement caractérisées par une perte de l'ATP intracellulaire, un gonflement cellulaire, une désintégration des organites et de la membrane plasmique suivit par une réaction inflammatoire (MAJNO et JORIS, 1995).

Les changements morphologiques distinctifs de l'apoptose constituent des points culminants qui résultent d'une cascade de plusieurs phases précurseurs. Dans la phase précédant la dégradation apoptotique (caractérisée par les changements morphologiques et la fragmentation de l'ADN), il se produit une activation en cascade de cystéines protéases spécifiques également appelées caspases (GREEN et KROEMER, 1998; MELDRUM, 1998). Ces dernières peuvent être divisées en deux groupes soit les caspases initiatrices et les caspases effectrices. L'induction des caspases initiatrices (caspases -2, -8, -9 et -10)

mènent à l'activation protéolytique des caspases effectrices telles que les caspases -3 et -7. Ces cystéines protéases effectrices sont en mesure de cliver plusieurs protéines nucléaires, cytosquelettiques et des protéines de signalisation. Il reste à définir la contribution exacte du clivage de ces différentes cibles au niveau des changements morphologiques typiques de l'apoptose. Par exemple, le clivage protéolytique de protéines nucléaires telles que la lamine B est impliqué dans la condensation de la chromatine. L'externalisation des phosphatidylsérines dans la membrane plasmique constitue également une conséquence de l'activité des caspases. Finalement, la fragmentation de l'ADN résulte du clivage du *DNA fragmentation factor 45/inhibitor of caspase-activated DNase* (DFF45/ICAD) par la caspase-3 activée (NAGATA, 2000). L'inactivation protéolytique de ce facteur permet le relâchement et l'induction du *DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase* (DFF40/CAD) qui représente la DNase responsable de la fragmentation internucléosomale de l'ADN durant la phase terminale de l'apoptose.

Deux voies apoptotiques principales culminent par l'activation des caspases (BORGERS *et al.*, 2000). Une première voie implique des 'récepteurs de mort' membranaires tels que FAS/CD95/APO-1 et TNF- α R1 qui s'oligomérisent avec Fas ligand et TNF- α respectivement pour ensuite permettre le recrutement de protéines adaptatrices comme *Fas-associated death domain* (FADD) et finalement l'activation de la pro-caspase-8 (MELDRUM, 1998). La seconde voie intègre différents signaux intracellulaires (surchage calcique, stress oxydatif, dommages à l'ADN) qui convergent vers la mitochondrie provoquant ainsi le relargage de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c (GREEN et REED, 1998). Celui-ci, après sa fuite depuis l'espace intermembranaire des mitochondries vers le cytosol, est en mesure d'activer les caspases effectrices après association avec d'autres molécules comme l'*apoptotic protease*

activator factor (Apaf-1) et la pro-caspase-9 en présence d'ATP, pour former un complexe moléculaire appelé 'apoptosome' (GREEN et REED, 1998). La formation de cet apoptosome conduit à l'activation de la caspase-9 elle-même responsable de l'induction de la caspase-3.

Hotchkiss *et al* ont démontré, dans différents modèles de chocs septiques aussi bien chez l'animal que chez l'homme, une apoptose lymphocytaire et parenchymateuse dans le thymus, l'iléon, le colon, le poumon et le muscle squelettique (HOTCHKISS *et al.*, 1999; HOTCHKISS *et al.*, 2000). L'apoptose semble également impliquée dans la genèse de la dysfonction myocardique septique. Effectivement, il a été démontré que le TNF- α ou l'endotoxine pouvaient induire *in vitro* l'apoptose de cardiomyocytes de rats à des taux compatibles avec ceux observés lors du sepsis expérimental (MCDONALD *et al.*, 2000; NEVIERE *et al.*, 2001). Dans le cadre du choc septique, des signes apoptotiques précoces (caspase-3 activée) et tardifs (fragmentation de l'ADN) ont été observés puis corrélés avec la chute des performances cardiaques *ex vivo* et *in vivo* (MCDONALD *et al.*, 2000; FAUVEL *et al.*, 2001; NEVIERE *et al.*, 2001). Ainsi, les coeurs de rats septiques surexpriment plusieurs caspases (caspase -1, -3, -8, -9) par rapport aux coeurs de rats normaux et l'administration d'inhibiteurs de caspases (ZVAD.fmk) prévient l'apoptose des cardiomyocytes et la dysfonction myocardique induite par l'endotoxine (MELDRUM, 1998; NEVIERE *et al.*, 2001).

Les processus apoptotiques d'origine mitochondriale tels que la création de pores perméables transitionnelles (MPTP: pores non-spécifiques de la membrane mitochondriale externe) et le relargage du cytochrome c seraient impliqués dans la dysfonction myocardique septique (MELDRUM, 1998; MCDONALD *et al.*, 2000). Ainsi, l'intensité de la dépression myocardique est corrélée au niveau de cytochrome c relargué dans le

cytoplasme (MCDONALD *et al.*, 2000). D'ailleurs, la cyclosporine A, qui inhibe la création de MPTP, prévient l'apoptose et la dysfonction cardiaque dans les modèles de choc endotoxinique (HALESTRAP *et al.*, 1997). Les pores MPTP qui permettent le relargage sont le résultat d'une surcharge calcique mitochondriale, d'un stress oxydatif ou d'une diminution du potentiel membranaire (HALESTRAP, 1999). Un mécanisme alternatif pour la libération cytosolique du cytochrome c implique la formation de canaux dans la membrane mitochondriale externe via l'oligomérisation de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bax ou Bak (GREEN et REED, 1998). Des membres anti-apoptotiques de la même famille comme Bcl-2 et Bcl-xL sont en mesure d'interagir avec Bax ou Bak de manière à prévenir leur oligomérisation et à les séquestrer dans le cytoplasme, empêchant ainsi la formation de canaux apoptotiques mitochondriaux (GREEN et REED, 1998). Dans le cadre de la dysfonction myocardique endotoxinique, McDonald *et al* (MCDONALD *et al.*, 2000) ont observé un déséquilibre du ratio Bax / Bcl-2 en faveur de l'apoptose, alors que la surexpression de Bcl-2 par des souris transgéniques protège de la dépression cardiaque (LANCEL *et al.*, 2005).

3. Le macrophage migration inhibitory factor (MIF)

Récemment, le macrophage migration inhibitory factor (MIF) a également été identifié en tant que facteur déprimant les performances cardiaques dans le cadre d'un choc endotoxinique (GARNER *et al.*, 2003). Le macrophage migration inhibitory factor fut la première cytokine décrite après l'interféron et ce dès 1966 (figure 4) (BLOOM et BENNETT, 1966; DAVID, 1966). Initialement, il fut identifié pour son implication dans les phénomènes d'hypersensibilité retardée en tant que produit des lymphocytes T. Ce sont

d'ailleurs les connaissances acquises sur le MIF qui incitèrent Stanley Cohen à proposer le terme de cytokine en 1974 (BIGAZZI *et al.*, 1975). Durant les deux décennies suivant sa découverte, les propriétés du MIF se résumaient à des fonctions reliées à l'activation des macrophages telles que l'adhérence, la phagocytose et la migration (NATHAN *et al.*, 1971; NATHAN *et al.*, 1973; CHURCHILL *et al.*, 1975). Le clonage de l'ADN complémentaire du MIF humain en 1989 a permis d'élargir le spectre de ses fonctions biologiques de sorte que le MIF est maintenant considéré comme une cytokine clef de la réponse inflammatoire (WEISER *et al.*, 1989; BAUGH et BUCALA, 2002). En effet, la recherche de nouveaux régulateurs inflammatoires en 1991 a mené à la redécouverte du MIF en tant que molécule sécrétée par les cellules de l'adénohypophyse suite à une exposition au LPS (BERNHAGEN *et al.*, 1993). Cette observation indiquait donc que le MIF constituerait un lien entre le système endocrinien et immunitaire.

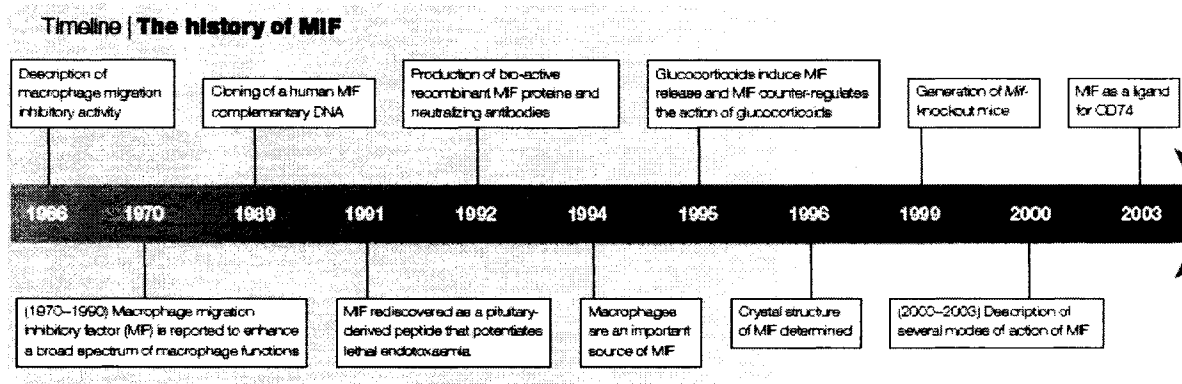


Figure 4. Points importants de l'histoire du MIF. Échelle de temps illustrant les faits marquants à propos du MIF depuis sa découverte en 1966. Figure tirée de (CALANDRA et ROGER, 2003).

3.1 Structure

Le gène codant pour le MIF mesure moins de 1kb et est constitué de trois exons séparés par deux courts introns de 100 à 200 pb (figure 5) (PARALKAR et WISTOW, 1994; BOZZA *et al.*, 1995; KOZAK *et al.*, 1995; MITCHELL *et al.*, 1995). Au niveau du génome humain, le gène *MIF* se situe sur le chromosome 22 (22q11.2) alors que son homologue murin est localisé sur le chromosome 10 dans le génome de la souris (WEISER *et al.*, 1989; WISTOW *et al.*, 1993; BERNHAGEN *et al.*, 1994; PARALKAR et WISTOW, 1994; BOZZA *et al.*, 1995; KOZAK *et al.*, 1995). Jusqu'à présent, la stabilité de l'ARN messager du MIF et la régulation transcriptionnelle de ce gène demeurent nébuleuses bien que plusieurs séquences consensus de liaisons à l'ADN soient identifiées au sein de son promoteur (figure 5) (BERNHAGEN *et al.*, 1998).

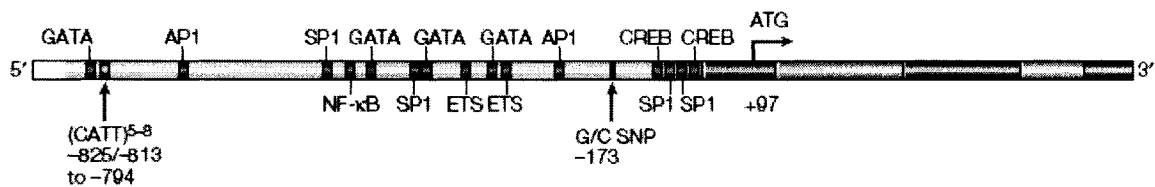


Figure 5. Structure du gène *MIF* humain. Le gène codant pour le MIF est composé de trois exons (107, 172 et 66 paires de bases) et de deux introns (188 et 94 paires de bases). Sa région promotrice comporte plusieurs séquences consensus de liaison à l'ADN pour différents facteurs de transcription ; *activator protein 1* (AP1), *nuclear factor-κB* (NF-κB), ETS, GATA, SP1 et *cAMP response element binding protein* (CREB). Figure tirée de (CALANDRA et ROGER, 2003).

Le transcrit de 0,8 kb codant pour le MIF est traduit en une protéine non-glycosylée de 114 acides aminés (12,5 kDa). Les analyses cristallographiques ont révélé

une structure homotrimérique dont chaque monomère consiste en deux hélices α anti-parallèles et six brins β (SUZUKI *et al.*, 1996). Ainsi, l'homotrimère est constitué de trois feuillets β entourés de six hélices α de manière à former un canal central dont les extrémités demeurent ouvertes (figure 6). La structure de cette protéine semble unique parmi les cytokines connues et elle ne présente pas d'homologie significative avec d'autres protéines à l'exception de la D-dopachrome tautomérase (DDT) (ESUMI *et al.*, 1998). D'autre part, le MIF est hautement conservé (90 %) entre les différentes espèces de mammifère et des homologues sont également identifiés chez d'autres organismes (poulet, poisson, plante et cyanobactérie) (WISTOW *et al.*, 1993; PASTRANA *et al.*, 1998; JAWORSKI *et al.*, 2001; GUILIANO *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2003). Une telle conservation inter-espèces de la structure du MIF laisse présager un rôle physiologique essentiel.

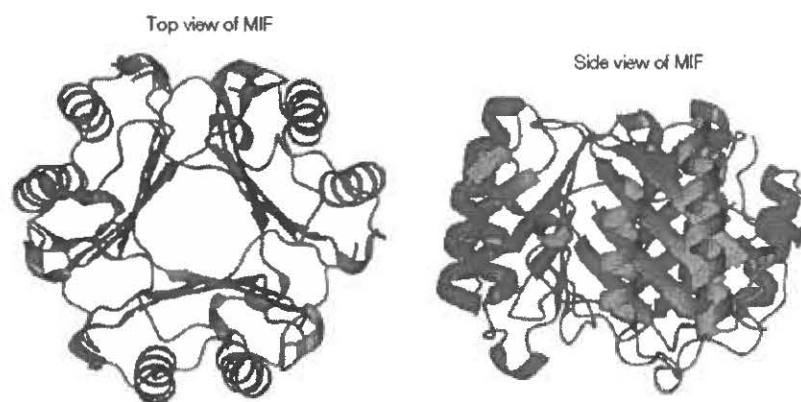


Figure 6. Structure homotrimérique du MIF. Vue tridimensionnelle de haut (à gauche) et de côté (à droite) de la structure homotrimérique du MIF. Figure adaptée de (CALANDRA et ROGER, 2003)

3.2 Activité enzymatique

Tel que mentionné précédemment, il y a uniquement le gène codant pour l'enzyme D-dopachrome tautomérase (DDT) qui présente une certaine homologie (27 %) avec le *MIF* (ESUMI *et al.*, 1998). D'ailleurs, les deux gènes sont situés relativement à proximité sur le chromosome 22 du génome humain, laissant supposer que les gènes *MIF* et *DDT* s'avèrent des duplicata d'un gène ancestral commun qui ont évolué de façon à accomplir des activités physiologiques divergentes. Cependant, il semble que le MIF a conservé certaines propriétés catalytiques dont l'implication dans ses fonctions biologiques demeure ambiguë (BENDRAT *et al.*, 1997; HERMANOWSKI-VOSATKA *et al.*, 1999; KLEEMANN *et al.*, 2000; LUBETSKY *et al.*, 2002). Ainsi, sa structure s'apparente aux enzymes procaryotes de type dopachrome tautomérase ; l'oxalocrotonate tautomérase, la 5-carboxyméthyl-2-hydroxymuconate isomérase et la chorismate mutase (SUBRAMANYA *et al.*, 1996; SUN *et al.*, 1996; SUZUKI *et al.*, 1996; SUGIMOTO *et al.*, 1999; SWOPE et LOLIS, 1999). Le MIF est d'ailleurs en mesure d'effectuer une activité enzymatique thiolprotéine oxydoréductase, phénylpyruvate kéto-énol isomérase et D-dopachrome tautomérase (ROSENGREN *et al.*, 1996; ROSENGREN *et al.*, 1997; KLEEMANN *et al.*, 1998; KLEEMANN *et al.*, 1999; SWOPE et LOLIS, 1999; LOLIS et BUCALA, 2003; NGUYEN *et al.*, 2003). Dans le même ordre d'idées, la capacité du MIF à convertir les catécholamines serait associée à ses activités catalytiques oxydoréductase et tautomérase (MATSUNAGA *et al.*, 1999). De plus, il semble que ses effets contre les glucocorticoïdes (abordés en page 45) dépendent davantage de son activité oxydoréductase que tautomérase (KLEEMANN *et al.*, 1999; KLEEMANN *et al.*, 2000). Pour l'instant, les corrélations entre les propriétés catalytiques du MIF et ses fonctions

physiologiques sont difficiles à mettre en évidence et cela persistera tant que son substrat naturel demeurera inconnu (BENDRAT *et al.*, 1997; HERMANOWSKI-VOSATKA *et al.*, 1999; KLEEMANN *et al.*, 2000; LUBETSKY *et al.*, 2002).

3.3 Sources cellulaires

Initialement découvert chez les lymphocytes T, le macrophage migration inhibitory factor a réellement émergé en 1993 pour former un pont entre le système immunitaire et endocrinien. Effectivement, c'est l'une des premières cytokines décrites en tant que produit exprimé et sécrété par les cellules corticotropes de l'adénohypophyse (BERNHAGEN *et al.*, 1993). Ensuite, son spectre d'expression s'est élargi grâce aux études chez des souris hypophysectomisées qui révélaient quand même des taux sanguins élevés de MIF en réponse à l'endotoxine (CALANDRA *et al.*, 1994). Cette observation signifiait que d'importantes sources de MIF, induites par le LPS, provenaient de tissus non-hypophysaires. Ainsi, il est maintenant démontré que l'expression du MIF s'effectue également chez les monocytes, macrophages, cellules dendritiques sanguines, lymphocytes B, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes et basophiles (BAUGH et BUCALA, 2002; LUE *et al.*, 2002). À la manière des cellules corticotropes de l'adénohypophyse, les cellules immunes expriment et entreposent le MIF dans des pools intracellulaires de façon à le relâcher rapidement suite à une stimulation. Ce mécanisme se distingue de celui de la majorité des autres cytokines qui nécessitent une transcription et une synthèse protéique supplémentaire avant leur sécrétion. D'autre part, le MIF n'arbore pas de séquence signal interne ou en N-terminal qui dirigerait la protéine vers le réticulum endoplasmique (WEISER *et al.*, 1989; BERNHAGEN *et al.*, 1994). D'ailleurs, certaines

évidences démontrent que le MIF serait sécrété via une voie non-classique (NAKAJIMA *et al.*, 1991; EICKHOFF *et al.*, 2001). Bien que les sources principales demeurent l'adénohypophyse, les monocytes/macrophages et les lymphocytes T, il semble que le MIF soit aussi produit par une panoplie de tissus (tableau 3). On le retrouve notamment chez les cellules et les organes qui sont exposés à l'environnement de l'hôte (poumon, épithélium de la peau, voies gastrointestinales et urinaires), ce qui corrobore son rôle de premier plan face à l'infection.

Sources tissulaires et cellulaires	Stimuli	Références
Adénohypophyse Cellules corticotropes	CRF, LPS	(BERNHAGEN <i>et al.</i> , 1993; NISHINO <i>et al.</i> , 1995)
Système immunitaire Cellules T, mastocytes Éosinophiles Monocytes/macrophages	Anti-CD3, PMA/ionomycine, PHA PMA, C5a, IL-5 LPS, TNF- α , IFN- γ , glucocorticoïdes, TSST-1, exotoxine A	(BACHER <i>et al.</i> , 1996; CHEN <i>et al.</i> , 1998) (MAKITA <i>et al.</i> , 1998) (CALANDRA <i>et al.</i> , 1994)
Glandes surrénales Zone glomérulée Zone fasciculée	LPS	(BACHER <i>et al.</i> , 1997)
Poumon Épithélium bronchique Macrophages alvéolaires	LPS	(BACHER <i>et al.</i> , 1997) (DONNELLY <i>et al.</i> , 1997)
Rein Tubule et glomérule Cellule épithéliale, endothélium Cellules de Kuppfer Cellules mésangiales	LPS LPS LPS, PDGF-AB, IFN- γ	(LAN <i>et al.</i> , 1996) (IMAMURA <i>et al.</i> , 1996) (TESCH <i>et al.</i> , 1998)
Foie Hépatocytes, cellules de Kuppfer	LPS	(BACHER <i>et al.</i> , 1997)
Pancréas Cellule β des ilots de Langerhans		(WAEBER <i>et al.</i> , 1997)
Cerveau Cortex, hypothalamus, neurones,	LPS	(NISHIBORI <i>et al.</i> ,

cellules gliales, épendyme, astrocytes, telencéphale		1996; BACHER <i>et al.</i> , 1998; SUZUKI <i>et al.</i> , 1999)
Système vasculaire Cellules endothéliales	LPS	(CHESNEY <i>et al.</i> , 1999)
Peau Kératinocytes, fibroblastes	Ultraviolet, LPS, TNF- α , IL-1, IL-8	(SHIMIZU, 2005)
Coeur Cardiomyocytes	LPS, H ₂ O ₂ , hypoxie	(TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2001; GARNER <i>et al.</i> , 2003)

Tableau 3. Distribution tissulaire et cellulaire du MIF. CRF : *corticotrophin-releasing factor* ; TNF : *tumor necrosis factor* ; IFN : interféron ; TSST : *toxic shock syndrome toxin-1* ; PMA : phorbol myristate acétate ; PHA : phytohémmagglutinine ; PDGF-AB : *platelet-derived growth factor-AB*. Tableau adapté de (BAUGH et BUCALA, 2002).

3.4 Mécanismes moléculaires

3.4.1 Récepteur du MIF

La signalisation des cytokines s'effectue généralement via leur liaison à un récepteur exprimé à la surface de la cellule cible. Normalement, le clonage d'une cytokine est rapidement accompagné par la découverte du récepteur associé à cette cytokine. Or, 14 années se sont écoulées entre le clonage du MIF en 1989 et l'identification d'un récepteur potentiel (WEISER *et al.*, 1989; LENG *et al.*, 2003). En effet, ce n'est qu'en 2003 que Leng *et al* ont identifié le CD74 en tant que récepteur membranaire du MIF possiblement impliqué dans certains événements précoces de la signalisation du MIF (figure 7) (LENG *et al.*, 2003). Le CD74 est reconnu pour le transport (chaperonne) des protéines de classe II du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (CRESSWELL, 1994). Cependant,

2 à 5 % des CD74 sont exprimés à la surface cellulaire de façon indépendante des protéines de classe II (SANT *et al.*, 1985; WRIGHT *et al.*, 1990). Ainsi, la présence membranaire du CD74 serait requise pour l'activation par le MIF des *extracellular signal regulated kinases 1 et 2* (ERK1/ERK2), la prolifération cellulaire et la production de prostaglandine E2 (PGE2) (MITCHELL *et al.*, 1999). De plus, le développement du système immunitaire chez les souris déficientes en CD74 est tellement altéré que cela ne peut être entièrement attribuable à une lacune en chaperonne de classe II (SHACHAR et FLAVELL, 1996). La liaison du MIF au CD74 serait donc essentielle bien que le domaine intracellulaire du CD74 ne possède pas de motif de liaison pour les molécules de signalisation. Ceci laisse supposer que le complexe MIF-CD74 nécessiterait le recrutement d'un récepteur supplémentaire en mesure de transmettre le signal. D'ailleurs, le CD44 constituerait un candidat idéal puisqu'il interagit avec le CD74 lors de stimulations immunitaires et possède des propriétés d'activation tyrosine kinase (NAUJOKAS *et al.*, 1993).

3.4.2 Influence sur l'expression de TLR4

À priori, il semble plutôt inusité que le MIF soit exprimé de façon constitutive par les macrophages et les tissus en contact direct avec l'environnement. Cependant, des études ont démontré que les macrophages déficients en MIF présentent une activité NF- κ B réduite et une production de TNF- α diminuée en réponse au LPS, alors qu'ils réagissent normalement face à d'autres stimuli incluant ceux d'origine bactérienne de type Gram + (ROGER *et al.*, 2003). Ce phénomène s'explique par une baisse d'expression de TLR4 en l'absence du MIF (ROGER *et al.*, 2001; ROGER *et al.*, 2003). En effet, le MIF régule à la

hausse l'expression de TLR4 en agissant sur des facteurs de transcription de la famille ETS tel que PU.1. Ainsi, la production constitutive du MIF permet aux macrophages et aux cellules en contact avec l'environnement externe de réagir promptement face à une bactérie invasive de type Gram -. Le MIF pourrait donc contribuer à la réponse inflammatoire excessive au cours du choc endotoxinique. Cet aspect est supporté par la corrélation entre les taux sériques élevés de MIF et l'augmentation des risques de décès chez les patients en choc septique (BEISHUIZEN *et al.*, 2001). De surcroît, cela apporte des explications partielles de mécanismes par lesquels les souris déficientes en MIF sont résistantes aux endotoxémies létales (BOZZA *et al.*, 1999).

3.4.3 Effets sur l'activité p53

La capacité du MIF à soutenir la survie cellulaire constituerait également un élément important dans la progression de la réponse inflammatoire. Effectivement, les travaux de Hudson *et al* (HUDSON *et al.*, 1999) ont démontré que l'ajout de MIF recombinant inhibe l'apoptose en supprimant l'activation transcriptionnelle dépendante de p53. D'ailleurs, les macrophages déficients en MIF, qui sont stimulés au LPS, présentent une viabilité réduite et des propriétés inflammatoires altérées (moins de TNF, IL-1 β et PGE2) par rapport aux cellules de type sauvage (MITCHELL *et al.*, 2002). L'inhibition de p53 par le MIF engendre une cascade d'activation impliquant ERK1/ERK2, cyclooxygénase2 (COX2), phospholipase A2 (PLA2) et PGE2 (figure 7b) (HONG *et al.*, 1999; PERSONS *et al.*, 2000; SHE *et al.*, 2000). Donc, le MIF potentialise la réponse immune innée en favorisant l'expression de TLR4 et en soutenant la survie cellulaire des cellules inflammatoires.

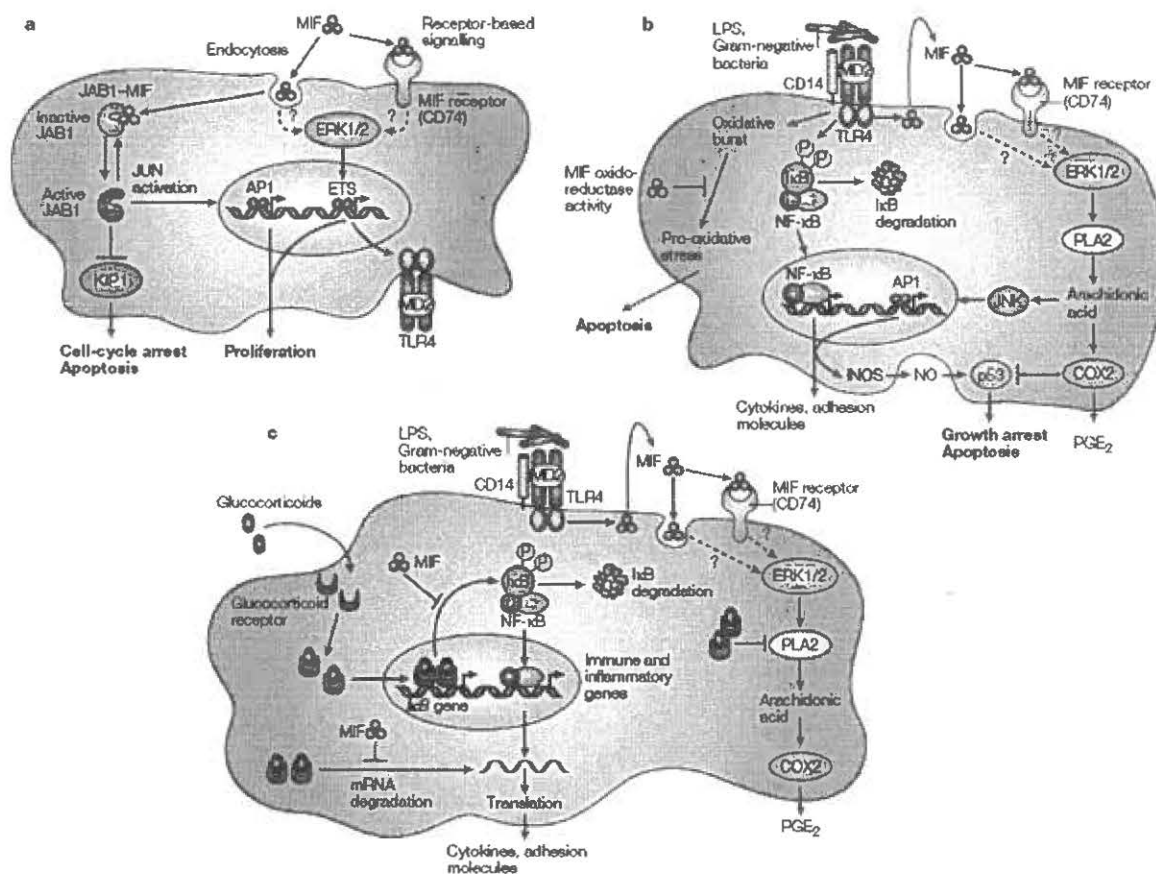


Figure 7. Mode d'action du MIF. a) L'action du MIF s'effectuerait soit via un récepteur (voie classique) ou par endocytose (voie non-classique). Le MIF est en mesure de se lier au CD74 et de phosphoryler les MAPkinases ERK1/ERK2. Le MIF favorise la prolifération cellulaire et active les facteurs de transcription de la famille ETS qui sont essentiels pour l'expression de TLR4. Le MIF se lie également à *JUN-activation domain-binding protein 1* (Jab-1) et prévient donc l'activation de JUN et la dégradation de l'inhibiteur de prolifération cellulaire KIP1 menant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. b) Le MIF augmente l'expression de TLR4 par les macrophages ce qui favorise la production de cytokines (incluant le MIF), de monoxyde d'azote (NO) et d'autres médiateurs en réponse à l'endotoxine. Suite à sa sécrétion, le MIF active une

cascade d'événements impliquant la phosphorylation de ERK1/ERK2, l'induction de la phospholipase A2 (PLA2) cytoplasmique, de l'acide arachidonique, de l'activité JUN N-terminal kinase (JNK) et de la prostaglandine E2 (PGE₂). Par la stimulation de l'activité oxydoréductase et de la cyclooxygénase 2 (COX2), le MIF prévient l'apoptose induite par une explosion oxydative ou par p53. **c)** Le MIF contrebalance les effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Il inhibe la synthèse de l'inhibiteur of nuclear factor- κ B (I κ B) et la déstabilisation des ARNm induites par les glucocorticoïdes. Le MIF prévient aussi l'inhibition de l'activité PLA2 et la diminution de production d'acide arachidonique induites par les glucocorticoïdes. Figure tirée de (CALANDRA et ROGER, 2003).

3.4.4 Interaction entre MIF et Jab-1

Des études récentes montrent que le MIF affecte directement l'activité transcriptionnelle de AP-1 en interagissant avec Jab-1 (KLEEMANN *et al.*, 2000). AP-1 est un facteur de transcription qui se lie à l'ADN en formant un hétérotrimère avec les oncoprotéines fos et Jun. Jab-1 stabilise le complexe AP-1/c-jun au niveau des sites de liaison à l'ADN de AP-1. Ainsi, en utilisant le MIF comme appât dans le cadre d'essais double-hybrides, l'équipe de Kleemann a démontré l'existence d'une interaction entre le MIF et le coactivateur de AP-1 (Jab-1). En plus de promouvoir la croissance cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire (SHAULIAN et KARIN, 2002), Jab-1 est aussi impliqué dans la dégradation de l'inhibiteur de cycle cellulaire p27^{Kip1}. Ainsi, la liaison entre le MIF et Jab-1 dans le cytoplasme réduit la dégradation de p27^{Kip1} en plus de déstabiliser la formation des complexes AP-1 (figure 7a).

3.5 Implication dans l'inflammation

À l'origine, le MIF fut identifié pour son implication dans les phénomènes d'hypersensibilité retardée en tant que produit des lymphocytes T (BLOOM et BENNETT, 1966; DAVID, 1966). Cette cytokine était donc associée davantage au système immunitaire adaptatif qu'à l'immunité innée. Cependant, le fait que le MIF soit produit et sécrété par les macrophages exposés au LPS ou à d'autres molécules proinflammatoires telles que le TNF- α et IFN- γ laisse entrevoir un rôle important dans la réponse innée (CALANDRA *et al.*, 1994). D'ailleurs, la sécrétion du MIF par les macrophages est non seulement rapide, mais requiert des concentrations de LPS 10 à 100 fois inférieures par rapport à celles nécessitées pour la production de TNF- α (CALANDRA *et al.*, 1994). Une fois relâché dans le tissu ou la circulation systémique, le MIF favorise directement ou indirectement la production de nombreuses molécules proinflammatoires telles que TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 (CALANDRA *et al.*, 1994; CALANDRA *et al.*, 1995; BACHER *et al.*, 1996; DONNELLY *et al.*, 1997; MAKITA *et al.*, 1998), monoxyde d'azote (BERNHAGEN *et al.*, 1994; BOZZA *et al.*, 1999), COX2, PGE2 (MITCHELL *et al.*, 1999; MITCHELL *et al.*, 2002), plusieurs métalloprotéinases et leurs inhibiteurs (ONODERA *et al.*, 1999; ONODERA *et al.*, 2002).

En considérant les propriétés proinflammatoires du MIF, il semble à priori paradoxal que ce dernier soit relâché par les mêmes cellules de l'adénohypophyse qui sécrètent l'ACTH (*adrenocorticotropin hormone*) (CALANDRA *et al.*, 1995). En effet, l'ACTH favorise la production des glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Or, les glucocorticoïdes sont de puissants anti-inflammatoires en s'opposant à la production des cytokines de l'inflammation par une action directe au niveau de la transcription de leurs

gènes. Cependant, à l'inverse des autres cytokines, la sécrétion du MIF est induite par les hormones glucocorticoïdiennes au niveau de l'adénohypophyse et des cellules immunes (CALANDRA *et al.*, 1995; BACHER *et al.*, 1996). En fait, le MIF constitue une molécule de contre-régulation des effets immunosupresseurs des glucocorticoïdes. Concrètement, le MIF interfère avec les glucocorticoïdes au niveau transcriptionnel en supprimant l'induction par les stéroïdes du I κ B α cytoplasmique permettant ainsi la translocation nucléaire de NF- κ B (DAUN et CANNON, 2000) (figure 7c). Il empêcherait également la régulation négative des cytokines par les glucocorticoïdes tant à un degré transcriptionnel que post-transcriptionnel (CALANDRA et ROGER, 2003). *In vitro*, cette contre-régulation se traduit par le fait que le MIF prévient l'inhibition par les glucocorticoïdes au niveau de la sécrétion d'acide arachidonique chez des fibroblastes stimulés au TNF- α (MITCHELL *et al.*, 1999). Il favorise aussi la prolifération des cellules T en dépit de la présence d'hormones glucocorticoïdiennes (BACHER *et al.*, 1996). De plus, il permet la production de TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-8 par les cellules sanguines mononucléées malgré les effets répresseurs des glucocorticoïdes (CALANDRA *et al.*, 1995). *In vivo*, cette balance physiologique s'exprime par une corrélation entre les taux sériques de MIF et de glucocorticoïdes lors de l'infection (CALANDRA *et al.*, 1995; CALANDRA *et al.*, 2000). Le MIF agirait donc de concert avec les glucocorticoïdes afin de contrôler la réponse inflammatoire.

Bien que le MIF constitue un élément clef de la réponse inflammatoire et soit requis pour combattre l'infection, une forte production de ce dernier peut s'avérer nocif au cours d'une pathologie sévère telle qu'un choc septique. Ainsi, des quantités considérables de MIF ont été décelées dans le sérum de patients en choc septique de même que dans les tissus de souris septiques (BERNHAGEN *et al.*, 1993; CALANDRA *et al.*, 2000);

(BEISHUIZEN *et al.*, 2001). D'ailleurs, de fortes concentrations sanguines de MIF sont associées à des risques de mortalité plus élevés (BEISHUIZEN *et al.*, 2001). Dans les modèles animal, la co-injection de MIF recombinant avec du LPS ou *Escherichia coli* potentialise le choc endotoxinique ou septique chez la souris (BERNHAGEN *et al.*, 1993; CALANDRA *et al.*, 2000). De plus, la conception de souris déficientes en MIF a permis de constater la résistance de ces animaux face au LPS (BOZZA *et al.*, 1999). Dans le même ordre d'idées, l'usage d'anticorps neutralisants, spécifiques pour le MIF, améliore significativement les taux de survie des souris exposées à *E. coli* ou soumises à une perforation et ligature caecale (CLP) (BERNHAGEN *et al.*, 1993; CALANDRA *et al.*, 2000). Au niveau du potentiel thérapeutique, cette protection est conservée même lorsque l'anticorps est administré huit heures après l'initiation du choc septique. Cette observation s'avère cliniquement importante puisque les patients en choc septique sont généralement traités une fois que l'infection est bien établie et que les premiers symptômes se sont manifestés.

3.6 Implication dans la dysfonction myocardique du choc septique

Les propriétés proinflammatoires intrinsèques du MIF, le fait qu'il soit fortement exprimé par les cellules immunes innées et son rôle crucial dans la réponse des macrophages contre les produits microbiens constituent tous des évidences de l'implication du MIF dans le sepsis. D'ailleurs, tel que mentionné précédemment, le MIF est augmenté dans la circulation sanguine lors du choc septique et le fait de bloquer l'activité du MIF par des anticorps monoclonaux ou polyclonaux résulte en une amélioration notable de la survie des animaux septiques (BOZZA *et al.*, 1999;

CALANDRA *et al.*, 2000). Par contre, le mécanisme physiopathologique de la protection conférée par la neutralisation du MIF demeure incertain. En 2001, les travaux de Takahashi *et al* (TAKAHASHI *et al.*, 2001) ont montré une production considérable de MIF chez des cardiomyocytes en hypoxie. Plus récemment, Garner *et al* (GARNER *et al.*, 2003) ont démontré que le MIF est exprimé et entreposé constitutivement dans le cytoplasme des cellules myocardiques. Ces réserves de MIF au sein du myocarde sont relâchées en réponse au LPS, suggérant ainsi l'implication du MIF cardiaque lors de chocs septiques. D'ailleurs, cette même étude (GARNER *et al.*, 2003) montre que le blocage du MIF à l'aide d'anticorps neutralisants renverse la dépression de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et la dilatation ventriculaire systolique induite par le LPS dans un modèle de souris. Ainsi, la prévention de la dysfonction cardiaque par la neutralisation du MIF lors d'un choc septique serait un mécanisme physiopathologique potentiel pour expliquer l'amélioration des taux de survie des animaux. Par contre, le mécanisme moléculaire précis par lequel le MIF altère les fonctions cardiaques demeure énigmatique. Le manuscrit (cf ci-après), qui constitue les fondements de ce mémoire, fait donc la lumière sur le mode d'action de la neutralisation du MIF dans la dysfonction myocardique endotoxinique.

Manuscript

CHAGNON, F., METZ, C. N., BUCALA, R. et LESUR, O. (2005) Endotoxin-Induced Myocardial Dysfunction: Effects of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Neutralization. *Circulation Research*; 96 (10): 1095-1102.

ABSTRACT

The pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction still remains controversial. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) has recently been identified as a cardiac-derived myocardial depressant factor in septic shock. Putative mechanisms by which MIF affects cardiac function are unknown. In an investigation of possible mechanisms of action, a rat model of endotoxin toxicity was designed using intraperitoneal (I/P) injection of LPS with or without co-infusion of neutralizing anti-MIF or isotypic-matched antibodies. Echocardiographic evaluation revealed that MIF neutralization reversed endotoxin-induced myocardial dysfunction at 24 hrs post-injection. RNase protection assay (RPA) and Western blot established that MIF neutralization prevented LPS-induced mRNA expression and production of heart-derived inflammatory paracrine and autocrine cytokines such as IL-1s and IL-6. Moreover, MIF immunoneutralization increased heart Bcl-2/Bax protein ratio and suppressed endotoxin-induced release of mitochondrial cytochrome-c, as demonstrated by Western blotting. Inhibition of mitochondrial loss of cytochrome-c decreased in heart caspase-3 activity at 6 and 24 hrs post-injection. MIF neutralization also restored the LPS-induced deficient nuclear translocation of phospho-Akt and consequently the expression of the heart survival nuclear factor GATA-4. The restoration of the translocation/expression of survival factors by MIF inhibition resulted in lowered endotoxin-induced DNA fragmentation at 24 hrs, a hallmark of downstream cardiomyocyte apoptosis. Our data indicate that early inactivation of MIF significantly reverses the imbalance of pro-apoptotic to pro-survival pathways and reduces acute inflammation of the heart, thereby improving myocardial dysfunction induced by endotoxin.

INTRODUCTION

Severe sepsis and septic shock are leading and growing causes of morbidity and mortality in hospitalized patients (ANGUS *et al.*, 2001), and contribute to an incidence of almost 250 cases per 100,000 population per year in the United States². These conditions account for the deaths of 150,000 Americans per year and more than 75% involve cardiovascular failure with severe, sustained, and sometimes refractory hypotension¹⁻². Over the last decade, it has become clear that myocardial dysfunction is linked to cardio-vascular failure in human and experimental septic shock³⁻⁷. Bacteria and/or endotoxins (LPS) contribute to and initiate a sequence of cellular events that lead to decreased contractile efficiency and left ventricular enlargement and dysfunction⁸⁻¹⁰.

The sequelae of systemic infection can produce reversible or irreversible damage to cardiomyocytes, such as impairment of intracellular calcium homeostasis, alterations of excitation/contraction coupling, and enhanced programmed cell death (or apoptosis)¹⁰⁻¹². Apoptosis is a new culprit for cardiac failure and sepsis-induced heart dysfunction that is being increasingly targeted for potential therapies¹⁰⁻¹². Amongst the triggering molecules for this dysfunction are inflammatory mediators, including cytokines⁸ such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), which is abundantly produced in acute phase sepsis¹³. However, anti-TNF- α therapies have failed to improve the mortality of patients with severe sepsis and shock¹⁴, suggesting the involvement and commitment of other important mediators in this pathogenesis.

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a neuropeptide and inflammatory mediator, mainly involved in immune homeostasis¹⁵. Elevated concentrations of circulating MIF are found in animals and patients during septic shock¹⁶. Moreover,

deletion of the MIF gene or MIF protein immunoneutralization in animal models protects from lethal endotoxemia and septic shock ¹⁶⁻¹⁷. A recent study has demonstrated that MIF is constitutively expressed by the myocardium, is released in response to LPS challenge, and is a myocardial depressant factor in a mouse model of (LPS-) endotoxin-induced cardiac dysfunction ¹⁸. However, the precise mechanism by which MIF affects cardiac function still remains unknown.

It has been postulated that MIF is a major triggering molecule of LPS-induced heart dysfunction, leading to enhanced cardiac-derived inflammatory mediator expression and to increased apoptosis. Hence, it is hypothesized that neutralizing MIF i) can prevent LPS-induced myocardial dysfunction, ii) is correlated with a reduction in cardiac inflammatory mediator expression together with decreased apoptosis signaling and rate, and iii) can reduce LPS-induced cardiac apoptosis by a mitochondrial-dependent; p53-independent pathway with restoration of phospho-Akt and GATA4 nuclear translocation. The present study was aimed at verifying the contribution of MIF in myocardial dysfunction as well as addressing possible mechanisms by which MIF neutralization improves sepsis outcome using a rat model of endotoxin challenge.

METHODS (CUT VERSION)

Experimental animal model

Pathogen-free male Wistar rats (350 g) were purchased from Charles River laboratories Inc (Wilmington, MA) and received care in compliance with *The Guide to the Care and Use of Experimental Animals* from the Canadian Council of Animal Care (1993, CCAC, 2nd ed.). This protocol was approved by our institution's Ethics Committee for animal care and experimentation. Rats were given an intraperitoneal (I/P) injection of

1 ml phosphate-buffered saline (PBS) or 10 mg/kg of *Escherichia coli* 055:B5 LPS (Sigma) in 1 ml PBS. Concomitantly, mouse monoclonal anti-MIF (IgG₁, III.D.9) or isotypic-matched (IgG₁, HB49) control antibodies originating from comparable clones as those described by Calandra *et al*¹⁷, were injected (10 mg/kg in 1 ml PBS) I/P. These anti-MIF antibodies had been previously shown to neutralize murine MIF bioactivity *in vivo* and *in vitro*¹⁷. Note that rat MIF differs from mouse MIF by a single amino acid residue (mouse: Asn 54, rat Ser 54) that does not influence immunoreactivity with anti-MIF clone III.D.9)¹⁹. At 6 hrs or 24 hrs post-injection, the hearts were removed under isoflurane anesthesia, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Echocardiographic study

Transthoracic echocardiography was performed under isoflurane anesthesia (2%) prior to injection as well as 24 hrs post-injection. All measurements were performed using a s12 HP 5-12mHz high resolution small footprint transducer at a 60-Hz acquisition rate (Hewlett-Packard Sonos 5500) (details in data supplements). All echocardiographs were performed by the same qualified technician (with intra-observer variability below 15%) and quality control was ensured by members of the Cardiology Department according to actual recommendations²⁰.

RNA extraction and RNase Protection Assay

Heart samples were thawed on ice and total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNase protection assay, with the multiprobe template set rCK-2, was performed as described in the standard PharMingen (San Diego, CA) RNase protection kit protocol (details in data supplements). The intensity

of each band was analyzed and normalized to the values of the housekeeping gene L32, with normalized values used to quantify expression.

Western blotting

Standard Western blot analyses were performed to determine protein expression (details in data supplements). Forty to 100 µg of total proteins, and 10 to 20 µg of mitochondrial or nuclear proteins were separated on a 10% or 15% SDS polyacrylamide gel under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight at 4°C with: polyclonal rabbit anti-IL-6 (1:1000)(PeproTech, Rocky Hill, NJ), rabbit anti-IL-1β; anti-TNF-α (1:1000)(Biosource, Camarillo, CA), rabbit anti-Bcl-2 (1:200)(Calbiochem, Cambridge, MA), mouse anti-Bax; anti-TNFR1 (1:100-200); goat anti-actin (1:3000); rabbit anti-GATA-4 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz), anti-Fas (1:1000)(B&D Biosciences, Mississauga ONT), rabbit anti-phospho-Akt (1:1000); anti-cytochrome-c (1:2000); anti-phospho-p53 (1:1000); anti-p53 (1:1000)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA) and followed by appropriate species specific anti IgG-HRP antibodies. Bands were revealed using ECL reagents (details in data supplements).

Immunofluorescence

Briefly, slices of heart (details in data supplements) were incubated with rabbit anti-cleaved caspase-3 (1:50)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA), goat anti-myosin heavy chain (1:10)(Santa Cruz Biotechnology) and 1.5% mouse serum. Specific amplification was obtained by further incubation with mouse anti-rabbit Ig biotin

conjugate (1:1500)(Sigma) followed by QDot 605 streptavidin conjugate (Quantum Dot, Hayward,CA) for cleaved caspase-3, mouse anti-goat IgG FITC (1:50)(Santa Cruz Biotechnology) for myosin heavy chain and 2% mouse serum. Sections were analyzed using an Axioskop 2 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) at a magnification of 1000x.

Caspase-3 activity

Frozen heart samples were ground into a powder and resuspended with ice-cold lysis buffer. Homogenates were centrifuged and 100 μ g of proteins in the supernatants were diluted with assay buffer, and incubated at 37°C with the colorimetric substrates (Biomol, Plymouth, PA) Ac-DEVD-*p*NA (200 μ M) in 96-well microtiter plates (details in data supplements). Cleavage of the *p*-nitroaniline (*p*NA) dye from the peptide substrate was determined by measuring the absorbance at 405 nm in a ThermoMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Results were expressed in mDO / hr / milligram protein.

DNA fragmentation detection

A Nucleosome ELISA kit (Calbiochem) was used according to manufacturer's instructions for quantification of DNA fragmentation. Briefly, small pieces (40-50 mg) of hearts were homogenized in the provided lysis buffer, incubated on ice, and the supernatants were frozen at -20°C and further analyzed by ELISA. Results were expressed as a ratio of nucleosomes units relative to total protein concentration (details in data supplement).

STATISTICAL ANALYSIS

Results are expressed as mean \pm SD. A repeated measures one-way analysis of variance was used to evaluate within-group differences. Inter-group difference was tested using a two-way analysis of variance (repeated time measurements with treatment as independent variable) and the Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA). Log transformation was used when necessary. Correlations between data were obtained using a Spearman Rank correlation test for nonparametric parameters. $p < 0.05$ was considered as the threshold for significance.

RESULTS

Endotoxin (LPS)-induced myocardial dysfunction is reversed by MIF neutralization.

In order to validate our experimental model, serial *in vivo* echocardiographies (M-mode) were performed prior to (baseline) and 24 hrs after the experimental challenge (Fig. 1a,b). This allowed us to document that I/P injection of LPS together with the isotype Ab (further denoted as control), induced an almost 20% decrease in left ventricular ejection fraction (LVEF) and a 110% increase in LVESv at 24 hrs post-challenge (Fig. 2a,b, $p < 0.05$ vs baseline/normal). MIF neutralization by anti-MIF Ab in parallel to I/P challenge significantly reversed the LPS-induced fall in LVEF (Fig. 2a, $p < 0.05$ vs control) and also reduced the LPS-induced rise in LVESv by ~80% (Fig. 2b, $p < 0.05$ control). Earlier 6 hr time-point assessment revealed more variable LPS-induced LVEF decreases (10 to 15%) with marginal impact of MIF neutralization. Respective controls injected with PBS plus isotype Ab or plus anti-MIF Ab at similar concentrations did not modify echocardiographic parameter.

Figure 1

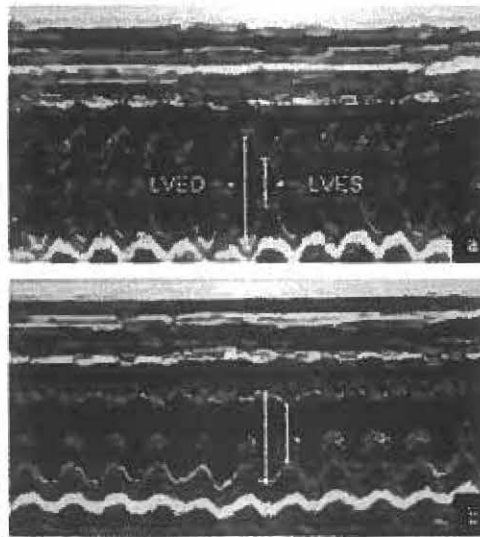


Fig 1: Echocardiographic assessment: Representative M-mode echocardiograms in normal rat at baseline and 24 hrs after LPS administration ((a) and (b), respectively). The left ventricular diameter during the end of systole (LVESd), left ventricular diameter during the end diastole (LVEDd) and the fractional shortening were established by the following formula $[(LVEDd - LVESd) / LVESd] \times 100$ and according to the standards for M-mode measurements set up by the American Society of Echocardiography.

Figure 2a

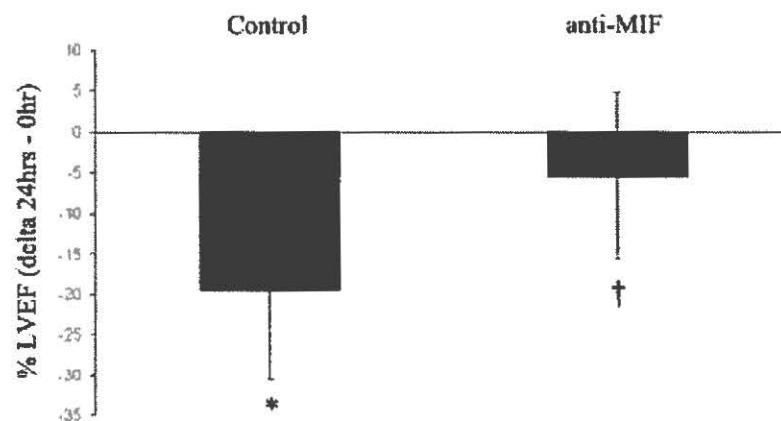


Figure 2b

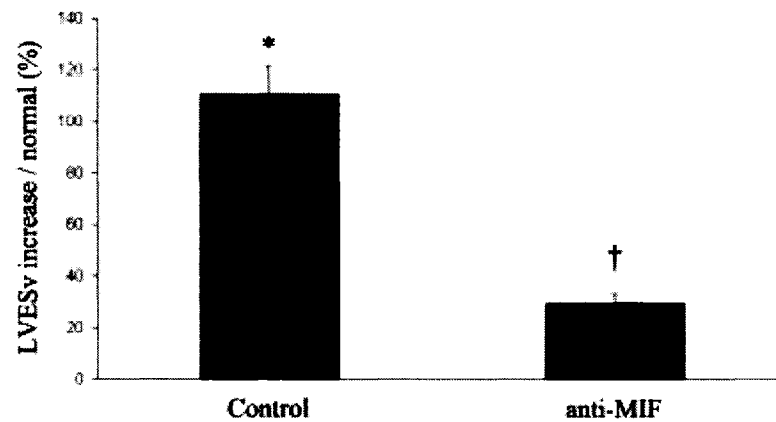


Fig 2: Modulation of Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF, %) and Left Ventricular-End Systolic volume (LVESv) following endotoxin (LPS) challenge with isotype or anti-MIF antibody injection (LVESv increase / normal, %): Rats (n=6) were challenged according to the methodology described in the Methods section. **a)** The bar chart represents measurement of the LVEF echographic gap (mean \pm SD) between 0 and 24 hrs after I/P injections. Each rat served as its own control with pre-injection echographies, constituting normal baseline data. **b)** The bar chart represents the percent increase in LVES volumes (mean \pm SD) in 24 hrs post-challenged rats as compared to normal group. * $p < 0.05$ vs normal. † $p < 0.05$ vs control (isotype Ab group).

MIF neutralization inhibits IL-6, IL-1 α/β and TNF- α myocardial production induced by LPS challenge.

RNase protection assays were performed to evaluate the compartmentalized impact of I/P LPS challenge on heart tissue. Results demonstrated respective increases of 818% and 378% in IL-1 α and IL-6 mRNA expressions at 24 hrs post-challenge (Fig. 3a,b,c, $p < 0.05$ vs normal). MIF neutralization downregulated this LPS-induced expression of IL-1 α

and IL-6 mRNA to 82% and -21% respectively, and similar modulations of IL-1 β and IL-1ra mRNA expressions (Fig. 3a,b,c, $p < 0.05$ vs control). Modulation of IL-1 β and IL-6 mRNA expressions was paralleled by myocardial protein levels (Fig. 3d). On the other hand, LPS challenge induced a transient rise in TNF- α transcript expression (1712%, 400%, 341%, 142% vs normal at 1; 3; 6; and 24 hrs respectively) but a more sustained protein overexpression, which is also inhibited by MIF neutralization at 24 hrs post-challenge (Fig. 3d).

Figure 3a

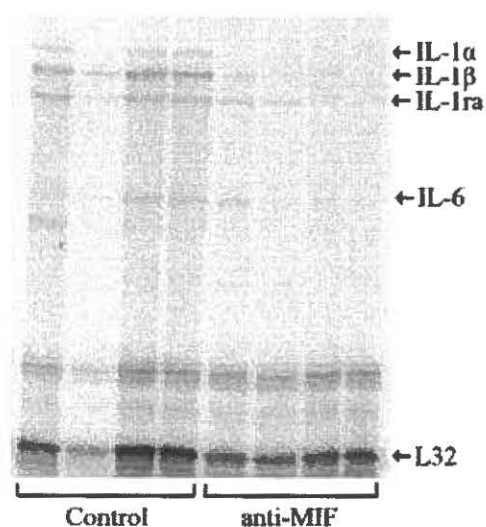


Figure 3b

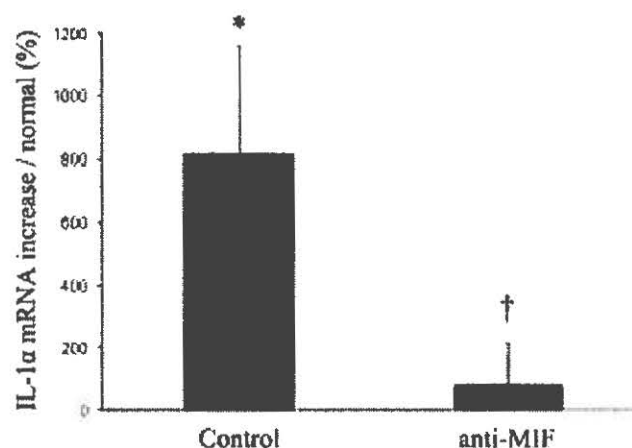


Figure 3c

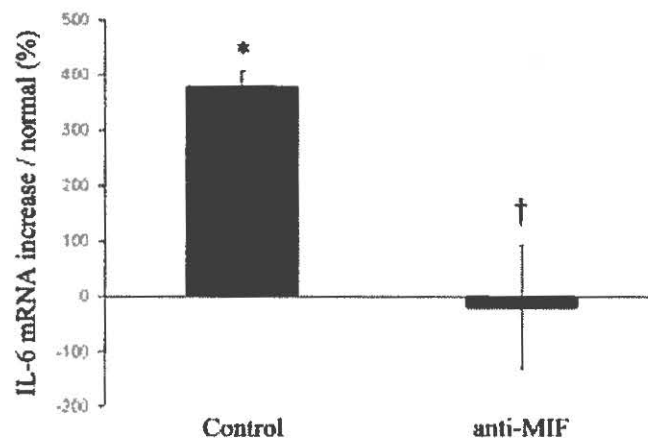


Figure 3d

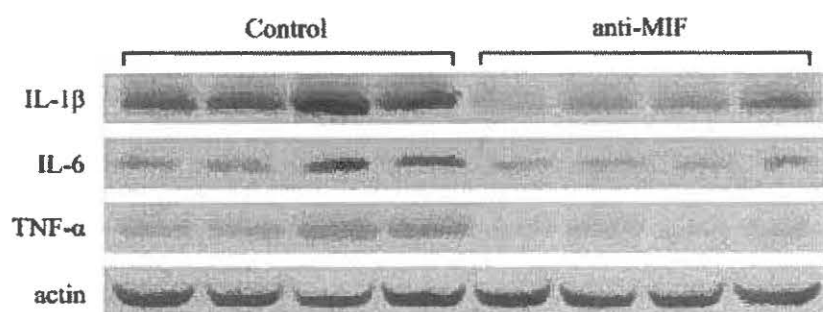


Fig 3: Effect of anti-MIF antibody on cardiac mRNA and protein expression of inflammatory cytokines induced by endotoxin: a) Representative RNase Protection Assay showing IL-1 α , IL -1 β , IL -1 α and IL-6 mRNA modulation in hearts from LPS + isotype Ab and LPS + anti-MIF Ab 24 hrs post-injected rats (n=4). b) c) Quantification of cardiac IL-1 α and IL-6 mRNAs. The bar chart represents the percent in IL-1 α (b) and IL-6 (c) mRNA (mean \pm SD) for 24 hr post-challenged rats as compared to normal group. Cytokine mRNA was normalized to L32 mRNA expression. d) Representative Western blots of cardiac IL-1 β , IL-6 and TNF- α protein levels from 24 hr post-challenged rats. Actin was used as loading control. * $p < 0.05$ vs normal. † $p < 0.05$ vs control (isotype Ab group).

MIF neutralization reduces LPS-induced cardiac cell apoptosis.

In order to assess whether LPS challenge induces cardiac cell apoptosis, immunofluorescence staining of rat hearts was performed, revealing active (cleaved) caspase-3, mostly nuclear in distribution, in myosin heavy chain-expressing cells at 24 hrs post-challenge (Fig. 4a). Whole heart caspase-3 enzymatic activity was also measured and showed levels ~ 3.1 -fold greater in LPS plus isotype Ab- challenged rats at both 6 or 24 hrs

post-challenge (Fig. 4b, $p < 0.05$ vs normal). This rise in enzyme activity was correlated with a drop in LVEF level (data from delta 24 hrs-0 hr, $n = 50$, $r = 0.519$, $p = 0.001$). On the other hand, hearts from rats receiving LPS plus anti-MIF Ab exhibited only a 1.3-fold induction of caspase-3 activity (Fig. 4b, $p < 0.05$ vs control), suggesting MIF neutralization is partly protective of caspase-3 activation.

To determine whether this level of caspase-3 activation led to end-stage (downstream) apoptosis or if survival (rescue) pathway(s) aborted the completion of the apoptotic process, DNA fragmentation was quantified in whole hearts. Nucleosome ELISA revealed a 322% increase in oligonucleosomal DNA fragmentation in hearts from LPS plus isotype Ab-treated rats at 24hrs post-challenge (Fig. 4c, $p < 0.05$ vs normal) and MIF neutralization reduced this LPS-induced DNA fragmentation by more than two-fold (Fig. 4c, $p < 0.05$ vs control).

Figure 4a

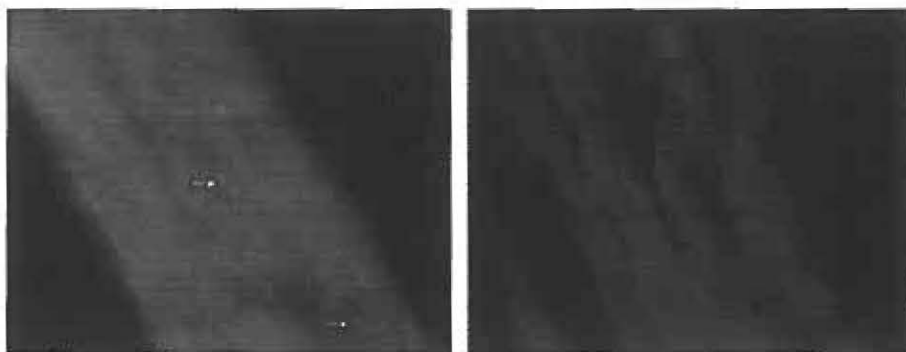


Figure 4b

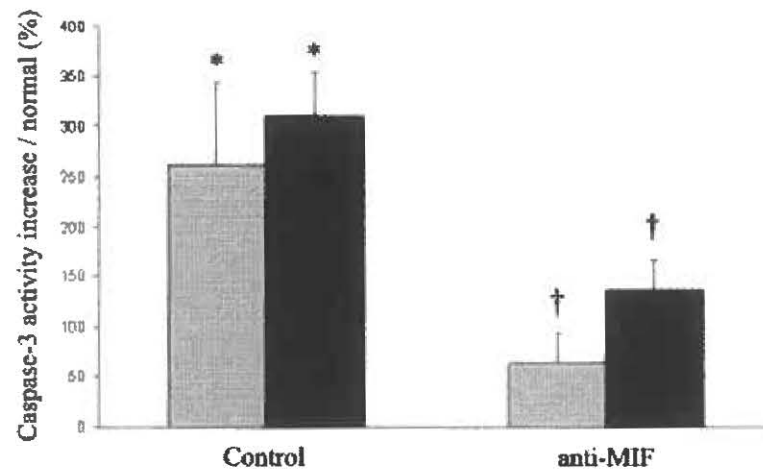


Figure 4c

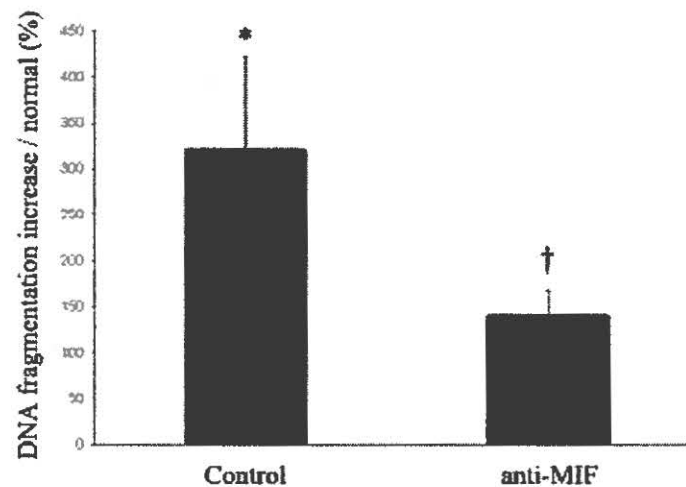


Fig 4: Effect of anti-MIF antibody on LPS-induced cardiomyocyte apoptosis: a) immunofluorescence imaging of a heart section from a 24 hr LPS post-challenged rat. Left panel: Active caspase-3 labelled with Qdot605 (red, indicated by white arrows), myosin heavy chain labelled with FITC (green) and nuclear labelled with DAPI (blue). Right panel: a negative control (secondary antibodies without the primary antibodies) with background staining. Magnification x 1000. b) Measurement of heart caspase-3 activity. Bar chart represents the percent increase in caspase-3 activity (mean \pm SD) for the 6 hr

(grey bars) and 24 hr (black bars) post-challenged rats as compared to normal group. **c)** Nucleosome determination of cardiac DNA fragmentation. Bar chart represents the percent increase in DNA fragmentation (mean \pm SD) for the 24 hr post-challenged rats as compared to normal group. * $p < 0.05$ vs normal. † $p < 0.05$ vs control (isotype Ab group).

MIF neutralization affects the mitochondrial apoptotic pathway.

To establish which of the main upstream apoptotic pathways is preferentially committed during the LPS-induced activation of caspase-3, the putative involvement of the mitochondrial pathway was evaluated by measuring mitochondrial and cytoplasmic cytochrome-c contents in LPS-challenged rat hearts at 6 hrs post-injection. Cytochrome-c levels were significantly lower in the mitochondrial fraction of heart extracts from LPS plus isotype Ab-challenged animals in comparison to normal. MIF neutralization restored the mitochondrial pool in rat heart extracts exposed to LPS (Fig. 5). The other upstream Fas-TNF Receptor apoptotic pathway remained unaffected in this setting (data not shown).

Figure 5

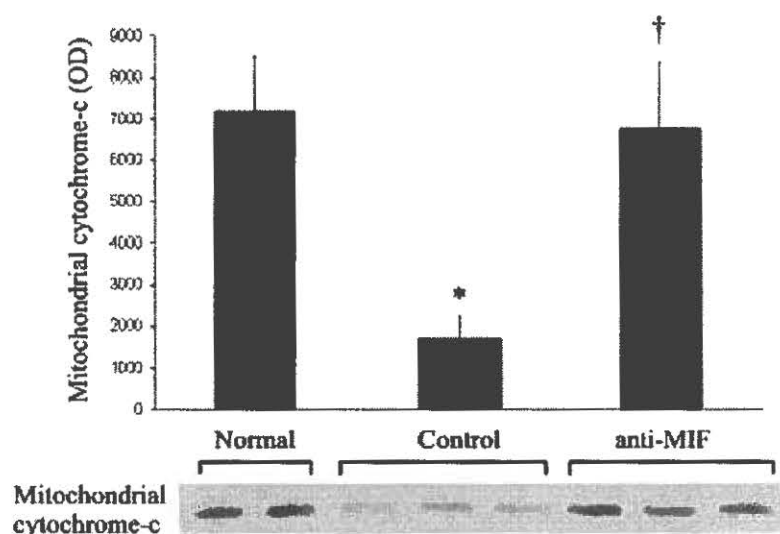


Fig 5: Effect of anti-MIF antibody on LPS-induced release of heart mitochondrial cytochrome-c: Western blot of heart mitochondrial cytochrome-c from control, LPS + isotype control Ab and LPS + anti-MIF Ab in 6 hr post-challenged rats. Bar chart represents cytochrome-c densitometry (mean \pm SD) of the mitochondrial fraction. * $p < 0.05$ vs normal. † $p < 0.05$ vs control (isotypic Ab group).

MIF neutralization induces Bcl-2 dominance in LPS-challenged heart and restores GATA-4 and phospho-Akt nuclear translocations.

To determine which molecular cascade is inhibited by MIF neutralization during LPS-induced heart apoptosis, mitochondria-associated pro-survival Bcl-2 and pro-apoptotic Bax were measured as representative modulating proteins. The Bcl-2/Bax ratio remained stable in heart extracts from rats injected with LPS plus isotype Ab as well as in normal, whereas MIF neutralization revealed an almost two-fold increase at 6hrs post-challenge (Fig. 6, $p < 0.05$ vs control).

Figure 6

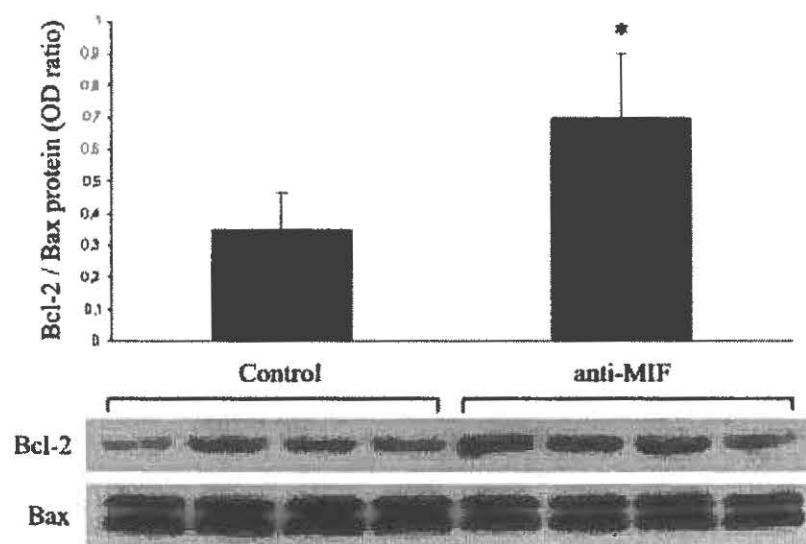


Fig 6: Effect of anti-MIF antibody on myocardial pro-survival and pro-apoptotic proteins: Representative Western blots of cardiac Bcl-2 and Bax from LPS + isotype Ab and LPS + anti-MIF Ab 24 hr post-challenged rats. Bar chart represents the densitometry of the cardiac Bcl-2-to-Bax protein ratio (mean \pm SD). * $p < 0.05$ vs control (LPS + isotype Ab group).

The transcription factor GATA-4 has previously been identified as a specific myocardial survival factor that induces the transcription and expression of Bcl-2⁴¹, which, together with phospho-Akt, is also associated with cell survival. The presence of these mediators was investigated in heart nuclear extracts at 6 hrs post-LPS injection. LPS challenge induced more than a two-fold drop in GATA-4 and the near disappearance of phospho-Akt nuclear translocation respectively, whereas MIF neutralization restored their presence (Fig. 7a-b). These events were p53 independent (or at least phosphorylated p53-

independent) (Fig. 7c), which is consistent with the known involvement of p53 in several MIF-mediated apoptotic processes²¹⁻²².

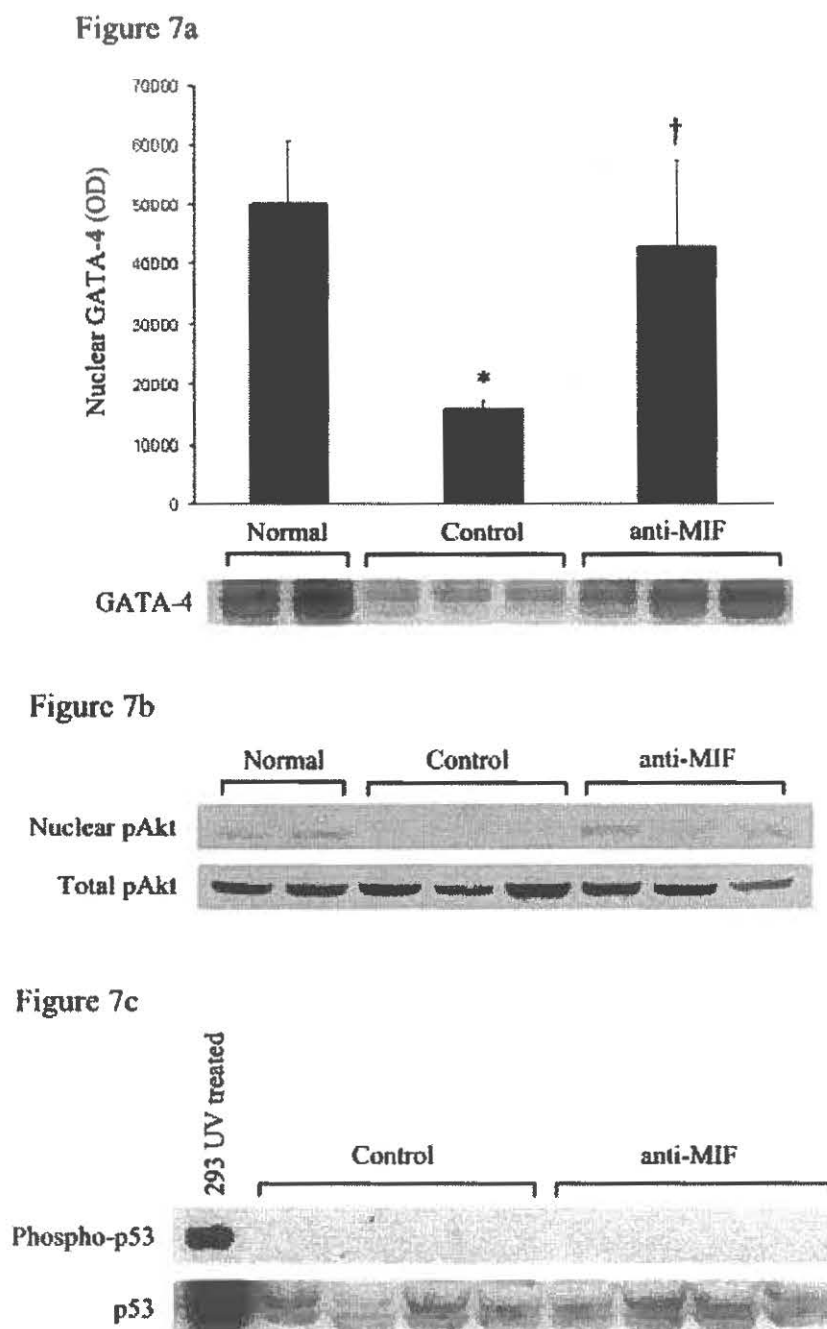


Fig 7: Effect of anti-MIF antibody on heart survival factors: Representative Western blots of **a)** heart nuclear GATA-4 from normal, LPS + isotype control Ab and LPS + anti-

MIF Ab of 6 hr post-challenged rats. Bar chart represents the densitometry of nuclear GATA-4 (mean \pm SD). **b)** nuclear and total phospho-Akt from normal, LPS + isotype Ab (control) and LPS + anti-MIF Ab 6 hr post-challenged rats. **c)** cardiac phospho-p53 and p53 from 24 hr post-challenged rats. 293 UV-treated cell extracts were used as quality control for anti-phospho-p53 antibody. * $p < 0.05$ vs normal. † $p < 0.05$ vs control (isotype Ab group).

DISCUSSION

The present study demonstrates that MIF neutralization reverses endotoxin-induced myocardial dysfunction in an experimental rat model. Moreover, MIF neutralization prevented LPS-induced mRNA and protein expressions of heart-derived inflammatory paracrine and autocrine cytokines such as IL-1s, IL-6 and TNF- α which can be potentially harmful as myocardial depressants. Consequently, this study revealed that MIF blockade significantly inhibited endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis, leading to a proposed mechanism by which MIF mediates endotoxin-induced myocardial dysfunction. Under the proposed mechanism, MIF blockade induces i) an increase in Bcl-2/Bax ratio that inhibits the release of mitochondrial cytochrome-c, ii) an inhibition in the loss of mitochondrial cytochrome-c which prevents caspase-3 activation, iii) a restoration of the nuclear translocation of survival factors GATA-4 and phospho-Akt, and, iv) a reduction in DNA fragmentation, which is a hallmark of downstream apoptosis. Overall, inhibition of MIF partially reverses the imbalance of pro-apoptotic to pro-survival pathways, thus reducing acute inflammation and myocardial dysfunction induced by endotoxin or sepsis.

Myocardial dysfunction is part of sepsis-induced cardio-circulatory shock of which MIF is a contributive factor

Despite growing evidence, myocardial dysfunction remains a debated concept in the pathophysiology of septic shock ³⁻⁷. Many reports describing myocardial dysfunction are from experimental models, but data from patients in septic shock ^{3-4,6} or from normal volunteers after endotoxin challenge have been obtained as well ^{5,7}. Hearts that become dysfunctional after LPS challenge or sepsis insult, demonstrate diffuse and reversible decreases in ejection fraction with enlargement of ventricular diameter/volumes ³⁻⁸. Recognized factors that influence this dysfunction include cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, and more recently MIF ^{8,18}. Other inflammatory mediators also include nitric oxide (NO), PAF, sphingosine and other lipid metabolites ^{8,23}. These incriminating factors are generally considered to be paracrine circulating molecules, however cardiac tissues also have been reported to synthesize TNF- α , IL-1 β and IL-6 ²⁴⁻²⁶. Moreover, increased local production of cytokines has been strongly implicated in myocardial dysfunction observed during several pathological conditions ²⁷⁻²⁸. Saito *et al* ²⁹ have demonstrated that LPS-induced IL-6 transcripts in mice hearts were mainly but not exclusively expressed by non-myocardial cells. However it is not clear whether other LPS-upregulated cytokine mRNAs originate from resident and/or infiltrating inflammatory cells. Nevertheless, increased synthesis and autocrine secretion of inflammatory cytokines may have local consequences on cardiac contractile protein mRNA expression. For instance, IL-1 β activates whereas IL-6 represses contractile protein genes ³⁰. Whether this autocrine production of cytokine, in addition to cytokines produced as a consequence of the systemic inflammatory response, contributes importantly to the loss of myocardial

contractility during sepsis, is unknown. On the other hand, MIF neutralization downregulated most of LPS-induced mRNA and protein upregulation for several heart cytokines including IL-1 α / β /ra, IL-6 and even TNF- α after 24 hrs. This adds to the IL-1 β -dependent suppression pathway described by Saito *et al* ²⁹ on cardiac IL-6-derived production and to the protection towards ventricular dysfunction conferred by CD14-deficient mice with blunted myocardial IL-1 β and TNF- α ³¹. As partly observed by Garner *et al* ¹⁸ in a mouse model, MIF blockade can reverse LPS-induced altered LVEF (minus 20%) and systolic ventricular enlargement as assessed by echocardiography. Several studies have shown that MIF^{-/-} mice are resistant to the lethal effects of high-doses of LPS and that anti-MIF antibodies protect normal mice from lethal peritonitis induced by cecal ligation and puncture or *E.coli* infusion ³². Moreover, Calandra *et al* ¹⁷ reported that anti-MIF treatment protected TNF- α knockout mice from lethal peritonitis, providing evidence of an intrinsic contribution of MIF to the pathogenesis of sepsis, independent of TNF- α . MIF is known to upregulate the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) on macrophages thus promoting the recognition of endotoxin-expressing bacterial pathogens, in addition to sustaining pro-inflammatory function by inhibiting p53-dependent apoptosis as well as counterregulating the immunosuppressive effects of glucocorticoids on immune cells ^{22-24,33-35}. MIF is constitutively expressed by a broad spectrum of cells and tissues, including immune cells, the anterior pituitary gland, the lung, the kidney and skeletal muscle ³⁴. Recently, Garner *et al* ¹⁸ demonstrated that MIF also is constitutively expressed by the myocardium and released in response to LPS, although its impact on cardiomyocyte apoptosis is unknown.

Heart apoptosis and MIF are intricately involved in sepsis-induced myocardial dysfunction

Myocardial apoptosis has recently been recognized as a significant contributor to cardiac failure as well as in endotoxin-induced heart dysfunction^{10-11, 36-37}. Caspase-3 activation and downstream TUNEL staining were reported to correlate with cardiac performance *ex vivo* and *in vivo*¹⁰⁻¹¹, as well as with myofibrillar protein cleavage *in vitro*³⁸. Thus, there is evidence that cardiomyocyte apoptosis is a genuine potential participant in sepsis-induced heart dysfunction, a concept further supported by the present study using both upstream (caspase-3, cytochrome-c) and downstream (oligonucleosomal fractions) markers. The low absolute levels of cardiomyocyte apoptosis observed in heart failure as well as in sepsis-induced heart dysfunction^{10-11, 36-38} is intriguing, and leads to suggest that rescue pathways may be involved. However, broad-spectrum caspase inhibitors significantly restore cardiac performance, at least in experimental set-ups, and this clearly correlates with improved heart function¹¹. An important observation in our model is that MIF neutralization significantly reversed heart apoptosis by reducing caspase-3 as well as DNA fragmentation. This is the first instance in which MIF is described as a potential apoptosis inducer in the heart, over and above its role in preventing apoptosis in inflammatory and immune cells^{22, 39}.

Mechanistic studies reveal that the mitochondrial pathways are preferentially targeted by MIF neutralization.

A cornerstone of the protection conferred by anti-MIF treatment appears to be the change in Bcl-2/Bax ratio. Indeed, as previously demonstrated, Bcl-2 protein expression declined in LPS-challenged cardiomyocytes^{10, 40}. Specifically, the half-life of Bcl-2 protein was shorter in response to inflammatory mediator⁴⁰. On the other hand, caspases have the

capacity to cleave and consequently downregulate Bcl-2 family members ⁴⁰. Thus, MIF neutralization upregulates heart Bcl-2/Bax ratio in a sepsis context by two dependent processes: i) recovery of LPS-induced deficient GATA-4 expression leading to increased Bcl-2 transcription and production, and ii) a rise in Bcl-2 expression that maintains mitochondrial integrity and prevents cytochrome-c release resulting in less LPS-induced caspase-3 activity for cleaving Bcl-2. The zinc finger transcription factor GATA-4 is a key regulator of heart development and an essential survival factor for postnatal cardiomyocytes. The critical role of GATA-4 as a survival factor may be explained, in part, by its function as an upstream activator of the Bcl-2 gene family and hence mitochondrial function and integrity ⁴¹. Recently, a series of experiments have probed whether the functional relationship between GATA-4 factor and apoptosis could be extended to cardiac myocytes. Kim *et al* ⁴² have demonstrated that apoptotic stimuli such as anthracyclines can suppress GATA-4 activity in freshly isolated adult rat cardiac myocytes and cultured HL-1 mouse cardiac muscle cells, due to decreased GATA-4 protein and mRNA expression levels.

A second point is that, activated phospho-Akt translocation to the nucleus is restored by MIF blockade. Akt-associated pathways and substrate proteins leading to antiapoptotic effects and cellular survival are complex, but recent studies suggest that biologically relevant targets of phospho-Akt action are localized in the nucleus ^{30, 43}. The present study did reveal a downregulation of nuclear phospho-Akt in LPS-challenged rat hearts with subsequent recovery to normal levels following MIF blockade. On the other hand, total phospho-Akt did not fluctuate significantly, indicating that the effects remained at the nuclear level. In fact, Morisco *et al* ⁴⁴ reported that Akt, one of the major downstream targets of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), positively regulates

transcriptional activity of GATA-4 in cardiomyocytes by phosphorylation and subsequent inactivation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β). Furthermore, GSK-3 β negatively regulated the transcriptional activity of GATA-4 through translocation of GATA-4 from the nucleus to the cytoplasm. This could explain why GATA-4 modulation follows the same pattern as nuclear phospho-Akt among the various modulators assessed in the present study. In addition, it is notable that Akt overexpression in mice improves cardiac contractility *in vivo* ⁴⁵.

Interestingly, protection of heart apoptosis occurs independently of p53 commitment. Indeed, MIF is released from cells of the innate immune system in bacterial infections diseases upon Toll-like receptor activation, and it contributes to the accumulation of inflammatory cells by inhibition of apoptosis ³⁹. Specifically, MIF sustains macrophage function by negatively regulating the p53-dependent apoptosis ²¹⁻²². However, our model demonstrated an absence of p53 activation (phosphorylation) in LPS-challenged rat hearts. This suggests that endotoxin induces cardiomyocyte apoptosis in a p53-independent manner. Consequently, MIF neutralization does not potentiate LPS-induced cardiomyocyte apoptosis by activating p53 but rather stimulates p53-dependent apoptosis of inflammatory cells, thereby reducing inflammation-induced cardiomyocyte apoptosis.

In summary, MIF is a significant contributor to endotoxin-induced myocardial dysfunction and is committed in cardiac apoptosis by a mitochondrial preferential pathway. MIF neutralization improves cardiomyocyte survival and function by increasing Bcl-2 dominance with restoration of GATA-4 and phospho-Akt nuclear translocation.

REFERENCES

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303-10.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moos M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New Engl J Med*. 2003; 348: 1546-54.
3. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*. 1984;100:483-90.
4. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest*. 1985;76:1539-53.
5. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med*. 1989;321:280-7.
6. Kumar A, Bunnell E, Lynn M, Anel R, Habet K, Neumann A, Parrillo JE. Experimental human endotoxemia is associated with depression of load-independent contractility index. *Chest*. 2004; 126: 860-67.
7. Krishnagopalan S, Kumar A, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8:376-88.
8. Raeburn CD, Calkins CM, Zimmerman MA, Song Y, Ao L, Banerjee A, Meng X, Harken AH. Vascular cell adhesion molecule-1 expression is obligatory for endotoxin-induced myocardial neutrophil accumulation and contractile dysfunction. *Surgery*. 2001;130:319-25.
9. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*. 1998;274:R577-95.
10. McDonald TE, Grinman MN, Carthy CM, Walley KR. Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H2053-61.
11. Fauvel H, Marchetti P, Chopin C, Formstecher P, Neviere R. Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1608-14.
12. Dispersyn GD, Borgers M. apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival. *News Physiol Sci*. 2001; 16: 41-47.
13. Bone RC. Sepsis and its complications: the clinical problem. *Crit Care Med*. 1994; 22: S8-S11.
14. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med*. 1999;25:556-66.
15. Baugh JA, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med*. 2002; 30: 9 (suppl): S27-S35.
16. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 1993;365:756-9.

17. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med.* 2000;6:164-70.
18. Garner LB, Willis MS, Carlson DL, DiMaio JM, White MD, White DJ, Adams GAt, Horton JW, Giroir BP. Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2500-9.
19. Fingerle-Rowson G, Koch P, Bikoff R, Lin X, Metz CN, Dhabhar FS, Meinhardt A, Bucala R. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. *American Journal of Pathology.* 2003; 162:47-56.
20. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58: 1072-83.
21. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:345-50.
22. Fingerle-Rowson G, Petrenko O, Metz CN, Forsthuber TG, Mitchell R, Huss R, Moll U, Muller W, Bucala R. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:9354-9.
23. Favory R, Lancel S, Marchetti P, Mordon S, Chopin C, Formstecher P, Neviere R. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: evidence for a role of sphingosine production. *Crit Care Med.* 2004; 32: 495-501.
24. Mann DL. Stress activated cytokines and the heart. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:341-54.
25. Horton JW, Maass DL, White J, Sanders B. Hypertonic saline-dextran suppresses burn-related cytokine secretion by cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H1591-601.
26. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 1999;104:271-80.
27. Patten M, Kramer E, Bunemann J, Wenck C, Thoenes M, Wieland T, Long C. Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo. *Pflugers Arch.* 2001;442:920-7.
28. Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, Lin H, Leiden JM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest.* 1998;101:2415-26.
29. Saito H, Patterson C, Hu Z, Runge MS, Tipnis U, Sinha M. Expression and self-regulatory function of cardiac interleukin-6 during endotoxemia. *Am J Physiol (HCP)* 2000; 279: H2241-8.
30. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999;96:857-68.
31. Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD14-deficient mice are protected against

- LPS-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2002; 106: 2608-15.
32. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*. 1999; 189: 341-6.
 33. Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2001; 414: 920-4.
 34. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 791-800.
 35. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 1994;179:1895-902.
 36. Davies MJ. Apoptosis in cardiovascular diseases. *Heart*. 1997; 77: 498-501.
 37. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, SemigranMJ, Bielsa-Masdeu A,William Dec G, Isreals S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome-c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:8144-49.
 38. Communal C, Sumandae M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 6252-56.
 39. Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J*. 2003;17:2221-30.
 40. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-12.
 41. Iwai-Kanai E, Hasegawa K. Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2004;259:163-8.
 42. Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, Suzuki YJ. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol*. 2003;63:368-77.
 43. Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7421-6.
 44. Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001;276:28586-97.
 45. Condorelli C, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo MA, Gu Y, Chung C, Latronico MVG, Napoli C, Sadoshima J, Croce CM, Ross J Jr. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. 99; 12333-38.

ABBREVIATIONS

LPS; Lipopolysaccharides, TNF- α ; Tumor Necrosis Factor-alpha, MIF; Macrophage Inhibitory Factor, pAkt; phosphorylated Akt, I/P; Intraperitoneal, PBS; Phosphate-buffered saline, RNAs; Ribonucleic acids, mRNA; messenger RNA, RNase; Ribonuclease, SDS; Sodium dodecyl sulfate, HEPES; N-(2-Hydroxyethyl) piperazineN-2-ethanesulfonic acid, CHAPS; 3[(3-Cholamidopropyl) dimethylammoniol]-propanesulfonic acid, DTT; Dithiothreitol, EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid, EGTA; Ethylene glycol-bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, PMSF; Phenylmethylsulphonylfluoride, Ac-DEVD-*p*NA; Ac-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline, mOD; milli-optical density, DNA; Deoxynucleic acid, SD; standard deviation, LVEF; Left Ventricular Ejection Fraction, LVESv; Left Ventricular End Systolic volume, IL-1 α - β ; Interleukin-1 alpha-beta, IL-6; Interleukin-6, TLR4; Toll-like receptor 4, TUNEL; Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick End Labeling, RPA; Ribonuclease Protection Assay, NO; Nitric oxide, PAF; Platelet Activating Factor, GSK-3 β ; Glycogen synthase kinase 3-beta, PI3-kinase; Phosphatidylinositol 3-kinase.

Discussion

La présente étude révèle que la neutralisation du MIF prévient la dysfonction myocardique induite par l'endotoxine dans un modèle expérimental chez le rat. De façon sous-jacente, le blocage du MIF empêche la hausse d'expression et de production dans le coeur de cytokines inflammatoires paracrines et autocrines (IL-1, IL-6 et TNF- α) en réponse au LPS. D'un point de vue mécanistique, cette étude démontre que la neutralisation du MIF inhibe l'apoptose des cardiomyocytes provoquée par l'endotoxine. Ainsi, le présent travail met en évidence un mécanisme précis par lequel le MIF influence la dépression cardiaque endotoxinique. Ce mécanisme implique que le blocage du MIF induit une augmentation du ratio protéique cardiaque de Bcl-2/Bax contribuant ainsi à prévenir le relâchement du cytochrome c mitochondrial induit par l'endotoxine. Cette inhibition de la perte de cytochrome c mitochondrial entraîne une réduction de l'activation de la caspase-3. La neutralisation du MIF rétablit la déficience provoquée par le LPS au niveau de la translocation nucléaire de phospho-Akt et par conséquent l'expression du facteur nucléaire de survie cardiaque GATA-4. Cette baisse d'activité caspase-3 et le rétablissement de la translocation/expression des facteurs de survie par le blocage du MIF résultent en une diminution de la fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose tardive. Globalement, l'inactivation du MIF lors d'un choc endotoxinique prévient le déséquilibre inflammatoire et apoptotique dans le coeur protégeant ainsi contre la dysfonction myocardique subséquente.

Les sepsis sévères et chocs septiques constituent des manifestations cliniques aiguës de déséquilibre des réponses immunes face à l'infection. Cette réponse inflammatoire inadéquate provoque ainsi des dommages tissulaires et des défaillances

multiorganiques. La défaillance myocardique dans le cadre du choc septique est de moins en moins contestée devant l'accumulation d'évidences obtenues par les modèles expérimentaux, les patients en choc septique et les volontaires sains injectés à l'endotoxine (PARKER *et al.*, 1984; PARRILLO *et al.*, 1985; SUFFREDINI *et al.*, 1989; KRISHNAGOPALAN *et al.*, 2002). Cette dysfonction cardiaque est caractérisée par une dilation biventriculaire accompagnée d'une baisse de la fraction d'éjection sanguine au niveau des ventricules cardiaques gauche et droit (PARKER *et al.*, 1984). Face à la réversibilité de cette défaillance, de nombreux médiateurs de la réponse infectieuse ont été soupçonnés d'altérer de façon transitoire les fonctions ventriculaires au cours du sepsis.

Parmi les facteurs suspectés, le MIF a récemment refait surface en tant que molécule effectrice importante du système immunitaire inné. Contrairement à la majorité des cytokines, le MIF est exprimé constitutivement par les cellules immunitaires et endocriniennes, également par les épithéliums de tissus en contact direct avec l'environnement externe, indiquant son rôle de médiateur dans les réponses face aux infections et au stress (CALANDRA et ROGER, 2003). En accord avec cette hypothèse, le MIF favorise l'expression par les macrophages de TLR4, la molécule de signalisation du complexe de récepteurs pour les endotoxines à la surface des bactéries Gram - (ROGER *et al.*, 2001). Les produits microbiens et cytokines proinflammatoires induisent le relâchement du MIF pré-formé qui a des fonctions de médiateur dans les réponses immunes innée et adaptative (CALANDRA et ROGER, 2003). Le MIF se distingue par sa capacité à annuler les effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes sur les cellules immunes et par sa capacité à maintenir les fonctions inflammatoires en inhibant l'apoptose p53-dépendante des macrophages (CALANDRA et BUCALA, 1995; MITCHELL *et al.*, 2002; FINGERLE-ROWSON *et al.*, 2003).

Les propriétés proinflammatoires intrinsèques du MIF, le fait qu'il soit fortement exprimé par les cellules immunes innées et son rôle crucial dans la réponse des macrophages contre les produits microbiens constituent tous des évidences de l'implication du MIF dans le sepsis. Cette hypothèse a été confirmée par de multiples modèles expérimentaux de chocs endotoxiniques et bactériens, qui ont démontré qu'une production excessive de MIF constitue un danger durant la phase aigüe d'un sepsis. D'ailleurs, des taux élevés de MIF ont été décelés dans le sang de patients en état de sepsis sévère ou de choc septique (BEISHUIZEN *et al.*, 2001; GANDO *et al.*, 2001; LEHMANN *et al.*, 2001). Ainsi, la neutralisation du MIF ou la délétion du gène *MIF* réduit considérablement l'activité proinflammatoire et par conséquent favorise la survie de l'hôte (BERNHAGEN *et al.*, 1993; CALANDRA *et al.*, 1995; CALANDRA *et al.*, 1998; BOZZA *et al.*, 1999; CALANDRA *et al.*, 2000). De façon plus précise, il a été montré que les souris *MIF*^{-/-} s'avèrent résistantes à des doses létales d'endotoxine et que les anticorps neutralisants le MIF protègent les souris normales des effets potentiellement mortels provoqués par l'infusion de *E.Coli* ou par la perforation et ligation caecale (CLP). De surcroît, le traitement anti-MIF protège les souris déficientes en TNF- α contre des péritonites normalement mortelles (CLP). Ce qui confirme un mécanisme d'action du MIF indépendant du TNF- α (CALANDRA *et al.*, 2000). D'ailleurs, les anticorps neutralisants le TNF- α se sont avérés efficaces seulement dans des modèles de chocs endotoxiniques, alors qu'ils ne présentaient aucune protection dans le cadre d'infusion de *E.Coli* ou de perforation et ligation caecale (CLP) (BAGBY *et al.*, 1991; ZANETTI *et al.*, 1992). En somme, lors d'un choc septique, le MIF est augmenté dans la circulation sanguine et le fait de bloquer l'activité du MIF par des anticorps monoclonaux ou polyclonaux résulte en une amélioration notable de la survie des animaux septiques (BOZZA *et al.*, 1999;

CALANDRA *et al.*, 2000). Par contre, le mécanisme physiopathologique de la protection conférée par la neutralisation du MIF demeure incertain.

Récemment, Garner *et al* (GARNER *et al.*, 2003) ont démontré que le MIF est exprimé et entreposé constitutivement dans le cytoplasme des cellules myocardiques. Ces réserves de MIF au sein du myocarde sont relâchées en réponse au LPS, suggérant ainsi l'implication du MIF cardiaque lors de chocs septiques. D'ailleurs, cette même étude (GARNER *et al.*, 2003) montre que le blocage du MIF à l'aide d'anticorps neutralisants renverse la dépression de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et la dilatation ventriculaire systolique induite par le LPS dans un modèle de souris. Cette réversibilité des fonctions cardiaques attribuée au blocage du MIF est également dévoilée par les échocardiographies dans notre modèle de rats endotoxiniques. Par conséquent, l'amélioration des performances cardiaques par la neutralisation du MIF lors d'un choc septique constituerait un mécanisme physiopathologique possible pour expliquer la survie accrue des animaux. Cependant, avant les travaux présents, le mécanisme moléculaire précis par lequel le MIF affecte les fonctions cardiaques demeurerait inconnu.

Dans cette optique, la présente étude fait la lumière sur le mode d'action de la neutralisation du MIF dans la dysfonction myocardique endotoxinique. En premier lieu, au niveau inflammatoire, les souris MIF^{-/-} révèlent une baisse des taux sériques de cytokines telles que IL-6 et TNF- α en réponse au LPS (BOZZA *et al.*, 1999). Or, plusieurs médiateurs inflammatoires comme le monoxyde d'azote, les sphingosines, le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β dépriment la contractilité ventriculaire (KRISHNAGOPALAN *et al.*, 2002). Bien que ces facteurs soient habituellement humoraux et agissent de façon paracrine, les tissus cardiaques sont en mesure de produire du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β (MANN, 1996; FRANTZ *et al.*, 1999; HORTON *et al.*, 2001). Par contre, il n'est pas clairement

défini si l'expression de ces cytokines induite par le LPS provient des cellules résidentes du coeur et/ou des cellules inflammatoires infiltrantes. À ce sujet, une étude chez la souris révèle que les transcrits d'IL-6 induits par le LPS étaient principalement mais non-exclusivement exprimés par les cellules non-myocardiques dans le coeur (SAITO *et al.*, 2000). Néanmoins, l'augmentation de la production et de la sécrétion locale de cytokines inflammatoires affecte les propriétés contractiles des cardiomyocytes (FENTZKE *et al.*, 1998; PATTEN *et al.*, 2001). Plus précisément, l'IL-6 et le TNF- α inhibent l'expression d'ARNm de protéines contractiles (actine et myosine cardiaque) alors que l'IL-1 β favorise leur transcription. D'ailleurs, l'article de Knuefermann (KNUEFERMANN *et al.*, 2002) associe la production déficiente de IL-1 β et TNF- α cardiaque avec la prévention de la dysfonction ventriculaire chez des souris transgéniques CD14^{-/-} stimulées au LPS.

Dans ce contexte, la présente étude démontre que la neutralisation du MIF prévient la hausse d'expression cardiaque induite par le LPS après 24 hrs au niveau de l'ARNm codant pour IL-1 α/β /ra et IL-6. Cet effet protecteur est confirmé par la modulation similaire des taux protéiques de IL-1 β et IL-6. D'autre part, la cinétique de transcription plus rapide et éphémère du TNF- α rend l'effet du blocage du MIF moins évident en ce qui a trait à l'ARNm du TNF- α . Par contre, la surproduction plus soutenue de la forme protéique du TNF- α permet de constater également une inhibition par le blocage du MIF. Ces observations reflètent en partie un des rôles fondamentaux du MIF qui consiste à potentialiser la réponse immune innée en favorisant l'expression de TLR4 et en soutenant la survie et l'accumulation des cellules inflammatoires via l'inhibition de p53 (ROGER *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2002; BAUMANN *et al.*, 2003). Or, la neutralisation du MIF empêche ce phénomène et par conséquent l'accumulation des cellules inflammatoires

dans le coeur est plus restreinte résultant ainsi en une baisse de la production locale de cytokines en réponse à l'endotoxine.

Les processus inflammatoires génèrent souvent des déséquilibres apoptotiques au sein des organes. Dans le cadre du sepsis expérimental, plusieurs études ont évalué le rôle de l'activation des voies apoptotiques chez différents types cellulaires (HOTCHKISS *et al.*, 1999; HOTCHKISS *et al.*, 1999; MCDONALD *et al.*, 2000; FAUVEL *et al.*, 2001; NEVIERE *et al.*, 2001; IWATA *et al.*, 2003). L'apoptose myocardique est maintenant considérée comme un constituant important de l'insuffisance cardiaque et de la dysfonction myocardique endotoxinique (DAVIES, 1997; NARULA *et al.*, 1999; MCDONALD *et al.*, 2000; FAUVEL *et al.*, 2001; NEVIERE *et al.*, 2001). D'ailleurs, dans les travaux présents et dans des études antérieures, des signes apoptotiques précoces (caspase-3 activée, relargage cytochrome c) et tardifs (fragmentation de l'ADN) ont été observés puis corrélés avec la chute des performances cardiaques *ex vivo* et *in vivo* (MCDONALD *et al.*, 2000; FAUVEL *et al.*, 2001; NEVIERE *et al.*, 2001). De plus, notre modèle montre que la neutralisation du MIF améliore les performances cardiaques lors du choc septique en prévenant l'apoptose des cardiomyocytes tel que mis en évidence par la réduction de l'activité caspase-3 et de la fragmentation de l'ADN. Cette étude est donc la première à décrire le MIF en tant que déclencheur potentiel de l'apoptose dans le coeur, malgré son implication dans la survie des cellules immunes et inflammatoires via p53 (ROGER *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2002; BAUMANN *et al.*, 2003).

De façon intéressante, selon notre modèle, la protection anti-apoptotique conférée par l'anti-MIF s'effectue de façon p53 indépendante au niveau des cardiomyocytes. En effet, bien que le MIF inhibe l'apoptose des cellules inflammatoires en prévenant l'activation de p53 (MITCHELL *et al.*, 2002; BAUMANN *et al.*, 2003), nos résultats

démontrent l'absence d'activation de p53 dans les coeurs de rats traités au LPS. Ces observations suggèrent que l'endotoxine induit l'apoptose des cardiomyocytes d'une manière indépendante de p53. Par conséquent, le fait de bloquer le MIF ne potentialise pas l'apoptose des cardiomyocytes induite par le LPS via l'activation de p53. De plus, la neutralisation du MIF stimule l'apoptose p53-dépendante des cellules inflammatoires réduisant ainsi l'apoptose des cardiomyocytes induite par l'inflammation.

D'un point de vue divergent, le niveau relativement faible de cardiomyocytes en phase apoptotique terminale (la perte de cardiomyocytes) semble insuffisant pour expliquer la progression dramatique de la dysfonction cardiaque observée lors du choc septique (MCDONALD *et al.*, 2000; FAUVEL *et al.*, 2001; NEVIERE *et al.*, 2001). En effet, bien que les deux voies apoptotiques principales (mitochondriale et récepteurs de mort) soient activées par l'endotoxine, seulement quelques cellules cardiaques dégénèrent vers la phase finale de l'apoptose (dégradation apoptotique) (MCDONALD *et al.*, 2000; NEVIERE *et al.*, 2001). Par conséquent, diverses études constatent un niveau relativement bas de cellules TUNEL-positives dans des coeurs de rats traités au LPS (MCDONALD *et al.*, 2000; NEVIERE *et al.*, 2001). Malgré ces taux faibles d'apoptose terminale, la présente étude et des travaux antérieurs démontrent l'initiation et l'exécution de phases apoptotiques précoces représentées entre autre par l'activation considérable de la caspase-3 et le relargage de cytochrome c mitochondrial (MCDONALD *et al.*, 2000; NEVIERE *et al.*, 2001). Or, des études récentes indiquent que la caspase-3 activée peut affecter directement les fonctions myocardiques via le clivage de myofilaments sarcomériques et l'induction de changements dans l'homéostasie calcique intracellulaire (CONDORELLI *et al.*, 2001; LAUGWITZ *et al.*, 2001; COMMUNAL *et al.*, 2002). Ainsi, l'inhibition

pharmacologique de l'activation des caspases prévient la dysfonction de coeurs septiques expérimentaux (MELDRUM, 1998; NEVIERE *et al.*, 2001).

En plus du clivage myofibrillaire par la caspase-3, le déséquilibre des fonctions mitochondriales intrinsèque des phases apoptotiques précoces serait davantage responsable de la dépression cardiaque que l'apoptose terminale (LANCEL *et al.*, 2005). D'ailleurs, un des fondements de la protection conférée par le blocage du MIF semble se situer au niveau du ratio des protéines mitochondriales Bcl-2/Bax. En effet, l'endotoxine et les médiateurs inflammatoires affectent la transcription des gènes apoptotiques, de sorte que le patron d'expression cardiaque de Bcl-2 et Bax est clairement pro-apoptotique quelques heures après l'injection du LPS (LANCEL *et al.*, 2005). De plus, la demi-vie de Bcl-2 est réduite en réponse aux stimuli inflammatoires (HAENDELER *et al.*, 1996). De façon spécifique, les caspases activées sont en mesure de cliver et d'inactiver les membres de la famille Bcl-2 (GREEN et REED, 1998; SLEE *et al.*, 1999). Ainsi, la surexpression de Bcl-2 chez des souris transgéniques améliore la survie et protège de la dysfonction myocardique induite par l'endotoxine (LANCEL *et al.*, 2005). Selon notre modèle, le traitement anti-MIF prévient également la déficience en Bcl-2 dans le coeur endotoxinique. En fait, la neutralisation du MIF empêche la baisse d'expression de GATA-4 induite par le LPS prévenant ainsi la chute de transcription et de production de Bcl-2. L'expression soutenue de Bcl-2 permet à cette protéine anti-apoptotique d'interagir avec Bax de manière à prévenir son oligomérisation et à le séquestrer dans le cytoplasme, réduisant ainsi la formation de canaux apoptotiques mitochondriaux. Par conséquent, le traitement anti-MIF prévient le relargage de cytochrome c mitochondrial induit par le LPS. L'inhibition de la fuite du cytochrome c depuis l'espace intermembranaire des mitochondries vers le cytosol résulte en une baisse d'activation de la caspase-3. La demi-

vie de Bcl-2 est donc prolongée à l'aide de l'anti-MIF étant donné qu'il y a moins de caspase-3 activée pour la cliver. La neutralisation du MIF intervient donc auprès de Bcl-2 dans le coeur par deux processus dépendants ; soit par l'augmentation d'expression de Bcl-2 via GATA-4 et par une stabilité accrue de Bcl-2.

Le facteur de transcription à doigts de zinc GATA-4 est impliqué dans la différenciation cellulaire, la prolifération des cellules progénitrices et la morphogénèse des organes durant l'embryogénèse (SUZUKI et EVANS, 2004). De façon intéressante, l'expression de GATA-4 est maintenue dans le coeur adulte laissant supposer un rôle dans la régulation des cardiomyocytes différenciés (SUZUKI et EVANS, 2004). En fait, plusieurs gènes impliqués dans le remodelage ventriculaire (myosine, troponine C, échangeur $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$) contiennent des sites de liaison pour GATA-4 dans leur promoteur (CHARRON et NEMER, 1999). Ainsi, la surexpression de GATA-4 chez des souris transgéniques ou des cardiomyocytes en culture est suffisante pour induire une réponse hypertrophique (LIANG *et al.*, 2001). En plus de réguler la croissance et la différenciation des cardiomyocytes, GATA-4 serait impliqué dans la survie des cellules cardiaques. En effet, des études récentes démontrent que des stimuli apoptotiques comme les anthracyclines suppriment l'activité GATA-4 chez des cardiomyocytes fraîchement isolés de rats et chez une lignée de cellules cardiaques de souris (HL-1) (KIM *et al.*, 2003). Cette perte d'activité est provoquée par la chute des niveaux protéique et transcriptionnel de GATA-4 en réponse au stimulus apoptotique (KIM *et al.*, 2003). Ce phénomène est d'ailleurs observé dans notre modèle où l'endotoxine induit une baisse de la production de GATA-4 qui est rétablie grâce au traitement anti-MIF. Cette réversibilité est primordiale dans la protection conférée par l'anti-MIF, car GATA-4 constitue un

activateur transcriptionnel clef des gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (IWAI-KANAI et HASEGAWA, 2004).

La modulation de GATA-4 dans notre modèle peut s'expliquer par le fait que la translocation nucléaire de la forme phosphorylée de Akt est altérée par le LPS puis rétablie par la neutralisation du MIF. Akt est une sérine-thréonine kinase principalement activée (phosphorylée) par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) et la 3-phosphoinositide-dependent kinase (PDK) au niveau cytoplasmique (DATTA *et al.*, 1999; KANDEL et HAY, 1999). Une fois activé, Akt s'accumule dans le noyau afin de réguler la transcription de différents gènes. D'ailleurs, certaines études suggèrent que plusieurs cibles nucléaires de Akt phosphorylé sont impliquées dans l'inhibition de l'apoptose (ANDJELKOVIC *et al.*, 1997; FENTZKE *et al.*, 1998; BIGGS *et al.*, 1999; BRUNET *et al.*, 1999; KOPS *et al.*, 1999). En fait, il est prouvé que Akt régule de façon positive l'activité transcriptionnelle de GATA-4 chez les cardiomyocytes via la phosphorylation et l'inactivation de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β) (MORISCO *et al.*, 2001). Or, la GSK-3 β régule négativement l'activité transcriptionnelle de GATA-4 en le transloquant du noyau vers le cytoplasme. Ainsi, la surexpression de Akt chez des souris transgéniques améliore la contractilité cardiaque via la voie GSK-3 β /GATA-4 (CONDORELLI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2003). Par conséquent, ces données expliquent les travaux présents qui montrent que le phospho-Akt nucléaire module de façon similaire au GATA-4 dans le noyau, alors que les fluctuations du phospho-Akt total demeurent négligeables. Ainsi, les voies en amont de la phosphorylation de Akt (PI3-kinase et PDK) seraient éventuellement à explorer afin de mieux définir les effets de la neutralisation du MIF sur le processus de signalisation dans le coeur endotoxinique.

Conclusion

La compréhension des mécanismes physiopathologiques précurseurs de la dépression cardiaque s'avère primordiale si l'on considère que la dysfonction cardio-circulatoire lors d'un choc septique constitue un élément majeur et initial dans l'induction et l'entretien des défaillances organiques subséquentes. Dans ce contexte, la présente étude a mis en évidence un mécanisme d'action par lequel la neutralisation du MIF prévient la dysfonction cardiaque lors d'un choc endotoxinique. Cette protection myocardique conférée par le traitement anti-MIF implique une diminution de l'expression et de la production cardiaque de cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α) en réponse au LPS. Le blocage du MIF protège également de façon directe et/ou indirecte (via l'atténuation de l'inflammation) du déséquilibre de la voie apoptotique mitochondriale activée dans le coeur lors du choc endotoxinique. Ainsi, l'inactivation du MIF permet de corriger la défaillance induite par le LPS au niveau de la translocation nucléaire de Akt phosphorylé. La présence nucléaire de Akt phosphorylé rétablit l'activité transcriptionnelle du facteur de survie cardiaque GATA-4 qui engendre à son tour l'expression cardiaque de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 normalement déficiente lors de choc septique. La production accrue de Bcl-2 maintient l'intégrité mitochondriale en empêchant Bax de former des canaux apoptotiques mitochondriaux. Par conséquent, la fuite de cytochrome c mitochondrial provoquée par l'endotoxine est estompée prévenant ainsi l'activation de la caspase-3. Il en résulte une réduction de la fragmentation de l'ADN (moins d'apoptose terminale) et possiblement moins de clivage des myofilaments sarcomériques. Donc, la diminution par l'anti-MIF de l'inflammation, de l'apoptose terminale, de l'activation de la caspase-3 et le maintien de l'équilibre mitochondriale se

répercutent au niveau des fonctions cardiaques de manière à renverser la dépression de la fraction d'éjection ventriculaire droite et la dilatation ventriculaire systolique induite par le LPS.

Ainsi, le MIF contribue de façon importante à la dysfonction myocardique endotoxinique en favorisant un processus inflammatoire dans le coeur et en déclenchant la voie apoptotique mitochondriale. D'ailleurs, il serait éventuellement intéressant de mieux définir si ce déclenchement d'apoptose est le résultat de l'action directe du MIF ou de l'inflammation engendrée par le MIF. De plus, il serait pertinent d'analyser la modulation des protéines impliquées dans la voie apoptotique mitochondriale lors d'une stimulation avec du MIF en l'absence de LPS. L'influence du MIF sur la production de monoxyde d'azote et de NO-synthase serait également à explorer étant donné l'importance du NO dans la dysfonction myocardique liée au sepsis.

Néanmoins, les travaux effectués jusqu'à maintenant suggèrent que la modulation pharmacologique ou immunologique de l'activité du MIF pourrait constituer un traitement potentiel chez les patients en état de choc septique. D'ailleurs, les compagnies pharmaceutiques Dyax et Baxter Healthcare ont conjointement amorcé un programme clinique de développement de stratégies à base d'anticorps anti-MIF dans le but de mettre au point un traitement contre le sepsis et d'autres maladies inflammatoires.

Remerciements

Je souhaiterais remercier mon directeur de recherche Dr. Olivier Lesur pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir guidé au cours de ma maîtrise. J'aimerais également remercier mes collègues et amis de travail de l'URP ; Marc Martel,

Diane Cloutier, Ginette Bilodeau, Claudia Beaulieu, Nancy Ramsay, Alexandre Cloutier, Chantal Guindi, Martin Richter et Simon Gaudreau pour leur support et l'atmosphère de travail agréable. Finalement, je souhaiterais remercier tous les étudiants et les chercheurs du département d'immunologie.

Bibliographie

- ABRAHAM, E. (1999). "Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis." *Intensive Care Med* **25**(6): 556-66.
- ALBERTI, C., C. BRUN-BUISSON, H. BURCHARDI, C. MARTIN, S. GOODMAN, A. ARTIGAS, A. SICIGNANO, M. PALAZZO, R. MORENO, R. BOULME, E. LEPAGE et R. LE GALL (2002). "Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study." *Intensive Care Med* **28**(2): 108-21.
- ANDJELKOVIC, M., D. R. ALESSI, R. MEIER, A. FERNANDEZ, N. J. LAMB, M. FRECH, P. CRON, P. COHEN, J. M. LUCOCQ et B. A. HEMMINGS (1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." *J Biol Chem* **272**(50): 31515-24.
- ANGUS, D. C., W. T. LINDE-ZWIRBLE, J. LIDICKER, G. CLERMONT, J. CARCILLO et M. R. PINSKY (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." *Crit Care Med* **29**(7): 1303-10.

- ANNANE, D., P. AEGERTER, M. C. JARS-GUINCESTRE et B. GUIDET (2003).
 "Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network." *Am J Respir Crit Care Med* **168**(2): 165-72.
- ANNANE, D., E. BELLISSANT et J. M. CAVAILLON (2005). "Septic shock." *Lancet* **365**(9453): 63-78.
- BACHER, M., A. MEINHARDT, H. Y. LAN, F. S. DHABHAR, W. MU, C. N. METZ, J. A. CHESNEY, D. GEMSA, T. DONNELLY, R. C. ATKINS et R. BUCALA (1998). "MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function." *Mol Med* **4**(4): 217-30.
- BACHER, M., A. MEINHARDT, H. Y. LAN, W. MU, C. N. METZ, J. A. CHESNEY, T. CALANDRA, D. GEMSA, T. DONNELLY, R. C. ATKINS et R. BUCALA (1997). "Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia." *Am J Pathol* **150**(1): 235-46.
- BACHER, M., C. N. METZ, T. CALANDRA, K. MAYER, J. CHESNEY, M. LOHOFF, D. GEMSA, T. DONNELLY et R. BUCALA (1996). "An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7849-54.
- BAGBY, G. J., K. J. PLESSALA, L. A. WILSON, J. J. THOMPSON et S. NELSON (1991). "Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis." *J Infect Dis* **163**(1): 83-8.
- BAUGH, J. A. et R. BUCALA (2002). "Macrophage migration inhibitory factor." *Crit Care Med* **30**(1 Supp): S27-S35.

- BAUMANN, R., C. CASAULTA, D. SIMON, S. CONUS, S. YOUSEFI et H. U. SIMON (2003). "Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway." *Faseb J* **17**(15): 2221-30.
- BEISHUIZEN, A., L. G. THIJIS, C. HAANEN et I. VERMES (2001). "Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary-adrenal function during critical illness." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(6): 2811-6.
- BENDRAT, K., Y. AL-ABED, D. J. CALLAWAY, T. PENG, T. CALANDRA, C. N. METZ et R. BUCALA (1997). "Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor." *Biochemistry* **36**(49): 15356-62.
- BERNARD, G. R., J. L. VINCENT, P. F. LATERRE, S. P. LAROSA, J. F. DHAINAUT, A. LOPEZ-RODRIGUEZ, J. S. STEINGRUB, G. E. GARBER, J. D. HELTERBRAND, E. W. ELY et C. J. FISHER, JR. (2001). "Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis." *N Engl J Med* **344**(10): 699-709.
- BERNHAGEN, J., T. CALANDRA et R. BUCALA (1998). "Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features." *J Mol Med* **76**(3-4): 151-61.
- BERNHAGEN, J., T. CALANDRA, R. A. MITCHELL, S. B. MARTIN, K. J. TRACEY, W. VOELTER, K. R. MANOGUE, A. CERAMI et R. BUCALA (1993). "MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia." *Nature* **365**(6448): 756-9.
- BERNHAGEN, J., R. A. MITCHELL, T. CALANDRA, W. VOELTER, A. CERAMI et R. BUCALA (1994). "Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of

- mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF)." *Biochemistry* **33**(47): 14144-55.
- BIGAZZI, P. E., T. YOSHIDA, P. A. WARD et S. COHEN (1975). "Production of lymphokine-like factors (cytokines) by simian virus 40-infected and simian virus 40-transformed cells." *Am J Pathol* **80**(1): 69-78.
- BIGGS, W. H., 3RD, J. MEISENHELDER, T. HUNTER, W. K. CAVENEE et K. C. ARDEN (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7421-6.
- BION, J. F. (2000). "Susceptibility to critical illness: reserve, response and therapy." *Intensive Care Med* **26 Suppl 1**: S57-63.
- BLOOM, B. R. et B. BENNETT (1966). "Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity." *Science* **153**(731): 80-2.
- BONE, R. C., R. A. BALK, F. B. CERRA, R. P. DELLINGER, A. M. FEIN, W. A. KNAUS, R. M. SCHEIN et W. J. SIBBALD (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." *Chest* **101**(6): 1644-55.
- BORGERS, M., L. VOIPIO-PULKKI et S. IZUMO (2000). "Apoptosis." *Cardiovasc Res* **45**(3): 525-527.
- BOZZA, M., L. F. KOLAKOWSKI, JR., N. A. JENKINS, D. J. GILBERT, N. G. COPELAND, J. R. DAVID et C. GERARD (1995). "Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes." *Genomics* **27**(3): 412-9.

- BOZZA, M., A. R. SATOSKAR, G. LIN, B. LU, A. A. HUMBLE, C. GERARD et J. R. DAVID (1999). "Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis." *J Exp Med* **189**(2): 341-6.
- BREALEY, D., M. BRAND, I. HARGREAVES, S. HEALES, J. LAND, R. SMOLENSKI, N. A. DAVIES, C. E. COOPER et M. SINGER (2002). "Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock." *Lancet* **360**(9328): 219-23.
- BROWN, G. C. (1999). "Nitric oxide and mitochondrial respiration." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 351-69.
- BRUN-BUISSON, C., F. DOYON, J. CARLET, P. DELLAMONICA, F. GOUIN, A. LEPOUTRE, J. C. MERCIER, G. OFFENSTADT et B. REGNIER (1995). "Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis." *Jama* **274**(12): 968-74.
- BRUN-BUISSON, C., P. MESHAKA, P. PINTON et B. VALLET (2004). "EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units." *Intensive Care Med* **30**(4): 580-8.
- BRUNET, A., A. BONNI, M. J. ZIGMOND, M. Z. LIN, P. JUO, L. S. HU, M. J. ANDERSON, K. C. ARDEN, J. BLENIS et M. E. GREENBERG (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-68.
- CALANDRA, T., J. BERNHAGEN, C. N. METZ, L. A. SPIEGEL, M. BACHER, T. DONNELLY, A. CERAMI et R. BUCALA (1995). "MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production." *Nature* **377**(6544): 68-71.

- CALANDRA, T., J. BERNHAGEN, R. A. MITCHELL et R. BUCALA (1994). "The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor." *J Exp Med* **179**(6): 1895-902.
- CALANDRA, T. et R. BUCALA (1995). "Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock." *J Inflamm* **47**(1-2): 39-51.
- CALANDRA, T., B. ECHTENACHER, D. L. ROY, J. PUGIN, C. N. METZ, L. HULTNER, D. HEUMANN, D. MANNEL, R. BUCALA et M. P. GLAUSER (2000). "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor." *Nat Med* **6**(2): 164-70.
- CALANDRA, T. et T. ROGER (2003). "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity." *Nat Rev Immunol* **3**(10): 791-800.
- CALANDRA, T., L. A. SPIEGEL, C. N. METZ et R. BUCALA (1998). "Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11383-8.
- CAO, Z., W. J. HENZEL et X. GAO (1996). "IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor." *Science* **271**(5252): 1128-31.
- CHARRON, F. et M. NEMER (1999). "GATA transcription factors and cardiac development." *Semin Cell Dev Biol* **10**(1): 85-91.
- CHEN, H., M. CENTOLA, S. F. ALTSCHUL et H. METZGER (1998). "Characterization of gene expression in resting and activated mast cells." *J Exp Med* **188**(9): 1657-68.

- CHESNEY, J., C. METZ, M. BACHER, T. PENG, A. MEINHARDT et R. BUCALA (1999). "An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma." *Mol Med* **5**(3): 181-91.
- CHURCHILL, W. H., JR., W. F. PIESSENS, C. A. SULIS et J. R. DAVID (1975). "Macrophages activated as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumor cells." *J Immunol* **115**(3): 781-6.
- COMMUNAL, C., M. SUMANDEA, P. DE TOMBE, J. NARULA, R. J. SOLARO et R. J. HAJJAR (2002). "Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6252-6.
- CONDORELLI, G., A. DRUSCO, G. STASSI, A. BELLACOSA, R. RONCARATI, G. IACCARINO, M. A. RUSSO, Y. GU, N. DALTON, C. CHUNG, M. V. LATRONICO, C. NAPOLI, J. SADOSHIMA, C. M. CROCE et J. ROSS, JR. (2002). "Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12333-8.
- CONDORELLI, G., R. RONCARATI, J. ROSS, JR., A. PISANI, G. STASSI, M. TODARO, S. TROCHA, A. DRUSCO, Y. GU, M. A. RUSSO, G. FRATI, S. P. JONES, D. J. LEFER, C. NAPOLI et C. M. CROCE (2001). "Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9977-82.
- CRESSWELL, P. (1994). "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." *Annu Rev Immunol* **12**: 259-93.
- DATTA, S. R., A. BRUNET et M. E. GREENBERG (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* **13**(22): 2905-27.

- DAUN, J. M. et J. G. CANNON (2000). "Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**(3): R1043-9.
- DAVID, J. R. (1966). "Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**(1): 72-7.
- DAVIES, M. J. (1997). "Apoptosis in cardiovascular disease." *Heart* **77**(6): 498-501.
- DONNELLY, S. C., C. HASLETT, P. T. REID, I. S. GRANT, W. A. WALLACE, C. N. METZ, L. J. BRUCE et R. BUCALA (1997). "Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome." *Nat Med* **3**(3): 320-3.
- EICKHOFF, R., B. WILHELM, H. RENNEBERG, G. WENNEMUTH, M. BACHER, D. LINDER, R. BUCALA, J. SEITZ et A. MEINHARDT (2001). "Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa." *Mol Med* **7**(1): 27-35.
- ESUMI, N., M. BUDARF, L. CICCARELLI, B. SELLINGER, C. A. KOZAK et G. WISTOW (1998). "Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF." *Mamm Genome* **9**(9): 753-7.
- FAUVEL, H., P. MARCHETTI, C. CHOPIN, P. FORMSTECHE et R. NEVIERE (2001). "Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(4): H1608-14.

- FENTZKE, R. C., C. E. KORCARZ, R. M. LANG, H. LIN et J. M. LEIDEN (1998). "Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart." *J Clin Invest* **101**(11): 2415-26.
- FERDINANDY, P., H. DANIAL, I. AMBRUS, R. A. ROTHERY et R. SCHULZ (2000). "Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure." *Circ Res* **87**(3): 241-7.
- FERRERO, E., D. JIAO, B. Z. TSUBERI, L. TESIO, G. W. RONG, A. HAZIOT et S. M. GOYERT (1993). "Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(6): 2380-4.
- FINGERLE-ROWSON, G., O. PETRENKO, C. N. METZ, T. G. FORSTHUBER, R. MITCHELL, R. HUSS, U. MOLL, W. MULLER et R. BUCALA (2003). "The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9354-9.
- FINKEL, M. S., C. V. ODDIS, T. D. JACOB, S. C. WATKINS, B. G. HATTLER et R. L. SIMMONS (1992). "Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide." *Science* **257**(5068): 387-9.
- FRANTZ, S., L. KOBZIK, Y. D. KIM, R. FUKAZAWA, R. MEDZHITOV, R. T. LEE et R. A. KELLY (1999). "Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium." *J Clin Invest* **104**(3): 271-80.
- GANDO, S., J. NISHIHARA, S. KOBAYASHI, Y. MORIMOTO, S. NANZAKI et O. KEMMOTSU (2001). "Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of systemic inflammatory response syndrome." *Intensive Care Med* **27**(7): 1187-93.

- GARNER, L. B., M. S. WILLIS, D. L. CARLSON, J. M. DIMAIO, M. D. WHITE, D. J. WHITE, G. A. T. ADAMS, J. W. HORTON et B. P. GIROIR (2003). "Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**(6): H2500-9.
- GODDARD, C. M., M. F. ALLARD, J. C. HOGG, M. J. HERBERTSON et K. R. WALLEY (1995). "Prolonged leukocyte transit time in coronary microcirculation of endotoxemic pigs." *Am J Physiol* **269**(4 Pt 2): H1389-97.
- GRANTON, J. T., C. M. GODDARD, M. F. ALLARD, S. VAN EEDEN et K. R. WALLEY (1997). "Leukocytes and decreased left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits." *Am J Respir Crit Care Med* **155**(6): 1977-83.
- GREEN, D. et G. KROEMER (1998). "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?" *Trends Cell Biol* **8**(7): 267-71.
- GREEN, D. R. et J. C. REED (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-12.
- GROCOTT-MASON, R. M. et A. M. SHAH (1998). "Cardiac dysfunction in sepsis: new theories and clinical implications." *Intensive Care Med* **24**(4): 286-95.
- GUILIANO, D. B., N. HALL, S. J. JONES, L. N. CLARK, C. H. CORTON, B. G. BARRELL et M. L. BLAXTER (2002). "Conservation of long-range synteny and microsynteny between the genomes of two distantly related nematodes." *Genome Biol* **3**(10): RESEARCH0057.
- HAENDELER, J., U. K. MESSMER, B. BRUNE, E. NEUGEBAUER et S. DIMMELER (1996). "Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2." *Shock* **6**(6): 405-9.

- HALESTRAP, A. P. (1999). "The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury." *Biochem Soc Symp* **66**: 181-203.
- HALESTRAP, A. P., C. P. CONNERN, E. J. GRIFFITHS et P. M. KERR (1997). "Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury." *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 167-72.
- HAZIOT, A., E. FERRERO, F. KONTGEN, N. HIJYA, S. YAMAMOTO, J. SILVER, C. L. STEWART et S. M. GOYERT (1996). "Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice." *Immunity* **4**(4): 407-14.
- HEARD, S. O., M. W. PERKINS et M. P. FINK (1992). "Tumor necrosis factor-alpha causes myocardial depression in guinea pigs." *Crit Care Med* **20**(4): 523-7.
- HERMANOWSKI-VOSATKA, A., S. S. MUNDT, J. M. AYALA, S. GOYAL, W. A. HANLON, R. M. CZERWINSKI, S. D. WRIGHT et C. P. WHITMAN (1999). "Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration." *Biochemistry* **38**(39): 12841-9.
- HILL, A. V. (1998). "The immunogenetics of human infectious diseases." *Annu Rev Immunol* **16**: 593-617.
- HONG, M., M. D. LAI, Y. S. LIN et M. Z. LAI (1999). "Antagonism of p53-dependent apoptosis by mitogen signals." *Cancer Res* **59**(12): 2847-52.
- HORTON, J. W., D. L. MAASS, J. WHITE et B. SANDERS (2001). "Hypertonic saline-dextran suppresses burn-related cytokine secretion by cardiomyocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(4): H1591-601.

- HOSHINO, K., O. TAKEUCHI, T. KAWAI, H. SANJO, T. OGAWA, Y. TAKEDA, K. TAKEDA et S. AKIRA (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." *J Immunol* **162**(7): 3749-52.
- HOTCHKISS, R. S., R. E. SCHMIEG, JR., P. E. SWANSON, B. D. FREEMAN, K. W. TINSLEY, J. P. COBB, I. E. KARL et T. G. BUCHMAN (2000). "Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock." *Crit Care Med* **28**(9): 3207-17.
- HOTCHKISS, R. S., P. E. SWANSON, B. D. FREEMAN, K. W. TINSLEY, J. P. COBB, G. M. MATUSCHAK, T. G. BUCHMAN et I. E. KARL (1999). "Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction." *Crit Care Med* **27**(7): 1230-51.
- HOTCHKISS, R. S., K. W. TINSLEY, P. E. SWANSON, K. C. CHANG, J. P. COBB, T. G. BUCHMAN, S. J. KORSMEYER et I. E. KARL (1999). "Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14541-6.
- HUDSON, J. D., M. A. SHOAIBI, R. MAESTRO, A. CARNERO, G. J. HANNON et D. H. BEACH (1999). "A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity." *J Exp Med* **190**(10): 1375-82.
- IMAMURA, K., J. NISHIHARA, M. SUZUKI, K. YASUDA, S. SASAKI, Y. KUSUNOKI, H. TOCHIMARU et Y. TAKEKOSHI (1996). "Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human kidney." *Biochem Mol Biol Int* **40**(6): 1233-42.

- IWAI-KANAI, E. et K. HASEGAWA (2004). "Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis." *Mol Cell Biochem* **259**(1-2): 163-8.
- IWATA, A., V. M. STEVENSON, A. MINARD, M. TASCH, J. TUPPER, E. LAGASSE, I. WEISSMAN, J. M. HARLAN et R. K. WINN (2003). "Over-expression of Bcl-2 provides protection in septic mice by a trans effect." *J Immunol* **171**(6): 3136-41.
- JAFRI, S. M., S. LAVINE, B. E. FIELD, M. T. BAHOROZIAN et R. W. CARLSON (1990). "Left ventricular diastolic function in sepsis." *Crit Care Med* **18**(7): 709-14.
- JARDIN, F., T. FOURME, B. PAGE, Y. LOUBIERES, A. VIEILLARD-BARON, A. BEAUCHET et J. P. BOURDARIAS (1999). "Persistent preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic study in patients with septic shock." *Chest* **116**(5): 1354-9.
- JAWORSKI, D. C., A. JASINSKAS, C. N. METZ, R. BUCALA et A. G. BARBOUR (2001). "Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*." *Insect Mol Biol* **10**(4): 323-31.
- KANDEL, E. S. et N. HAY (1999). "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." *Exp Cell Res* **253**(1): 210-29.
- KELLY, R. A., J. L. BALLIGAND et T. W. SMITH (1996). "Nitric oxide and cardiac function." *Circ Res* **79**(3): 363-80.
- KIEFT, H., A. I. HOEPELMAN, W. ZHOU, M. ROZENBERG-ARSKA, A. STRUYVENBERG et J. VERHOEF (1993). "The sepsis syndrome in a Dutch university hospital. Clinical observations." *Arch Intern Med* **153**(19): 2241-7.

- KIM, Y., A. G. MA, K. KITTA, S. N. FITCH, T. IKEDA, Y. IHARA, A. R. SIMON, T. EVANS et Y. J. SUZUKI (2003). "Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis." *Mol Pharmacol* **63**(2): 368-77.
- KIM, Y. K., S. J. KIM, A. YATANI, Y. HUANG, G. CASTELLI, D. E. VATNER, J. LIU, Q. ZHANG, G. DIAZ, R. ZIEBA, J. THAISZ, A. DRUSCO, C. CROCE, J. SADOSHIMA, G. CONDORELLI et S. F. VATNER (2003). "Mechanism of enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt." *J Biol Chem* **278**(48): 47622-8.
- KIMCHI, A., A. G. ELLRODT, D. S. BERMAN, M. S. RIEDINGER, H. J. SWAN et G. H. MURATA (1984). "Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study." *J Am Coll Cardiol* **4**(5): 945-51.
- KLEEMANN, R., A. HAUSSER, G. GEIGER, R. MISCHKE, A. BURGER-KENTISCHER, O. FLIEGER, F. J. JOHANNES, T. ROGER, T. CALANDRA, A. KAPURNIOTU, M. GRELL, D. FINKELMEIER, H. BRUNNER et J. BERNHAGEN (2000). "Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1." *Nature* **408**(6809): 211-6.
- KLEEMANN, R., A. KAPURNIOTU, R. W. FRANK, A. GESSNER, R. MISCHKE, O. FLIEGER, S. JUTTNER, H. BRUNNER et J. BERNHAGEN (1998). "Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase." *J Mol Biol* **280**(1): 85-102.
- KLEEMANN, R., A. KAPURNIOTU, R. MISCHKE, J. HELD et J. BERNHAGEN (1999). "Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration

inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF." *Eur J Biochem* **261**(3): 753-66.

KLEEMANN, R., H. RORSMAN, E. ROSENGREN, R. MISCHKE, N. T. MAI et J. BERNHAGEN (2000). "Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants." *Eur J Biochem* **267**(24): 7183-93.

KNUEFERMANN, P., S. NEMOTO, A. MISRA, N. NOZAKI, G. DEFREITAS, S. M. GOYERT, B. A. CARABELLO, D. L. MANN et J. G. VALLEJO (2002). "CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction." *Circulation* **106**(20): 2608-15.

KOPS, G. J., N. D. DE RUITER, A. M. DE VRIES-SMITS, D. R. POWELL, J. L. BOS et B. M. BURGERING (1999). "Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B." *Nature* **398**(6728): 630-4.

KOZAK, C. A., M. C. ADAMSON, C. E. BUCKLER, L. SEGOVIA, V. PARALKAR et G. WISTOW (1995). "Genomic cloning of mouse MIF (macrophage inhibitory factor) and genetic mapping of the human and mouse expressed gene and nine mouse pseudogenes." *Genomics* **27**(3): 405-11.

KRISHNAGOPALAN, S., A. KUMAR et J. E. PARRILLO (2002). "Myocardial dysfunction in the patient with sepsis." *Curr Opin Crit Care* **8**(5): 376-88.

KROWN, K. A., M. T. PAGE, C. NGUYEN, D. ZECHNER, V. GUTIERREZ, K. L. COMSTOCK, C. C. GLEMBOTSKI, P. J. QUINTANA et R. A. SABBADINI (1996). "Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death." *J Clin Invest* **98**(12): 2854-65.

- LAN, H. Y., W. MU, N. YANG, A. MEINHARDT, D. J. NIKOLIC-PATERSON, Y. Y. NG, M. BACHER, R. C. ATKINS et R. BUCALA (1996). "De Novo renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis." *Am J Pathol* **149**(4): 1119-27.
- LANCEL, S., P. PETILLOT, R. FAVORY, N. STEBACH, C. LAHORTE, P. M. DANZE, B. VALLET, P. MARCHETTI et R. NEVIERE (2005). "Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats." *Crit Care Med* **33**(3): 492-6.
- LAUGWITZ, K. L., A. MORETTI, H. J. WEIG, A. GILLITZER, K. PINKERNELL, T. OTT, I. PRAGST, C. STADELE, M. SEYFARTH, A. SCHOMIG et M. UNGERER (2001). "Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium." *Hum Gene Ther* **12**(17): 2051-63.
- LEHMANN, L. E., U. NOVENDER, S. SCHROEDER, T. PIETSCH, T. VON SPIEGEL, C. PUTENSEN, A. HOEFT et F. STUBER (2001). "Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis." *Intensive Care Med* **27**(8): 1412-5.
- LENG, L., C. N. METZ, Y. FANG, J. XU, S. DONNELLY, J. BAUGH, T. DELOHERY, Y. CHEN, R. A. MITCHELL et R. BUCALA (2003). "MIF signal transduction initiated by binding to CD74." *J Exp Med* **197**(11): 1467-76.
- LIANG, Q., L. J. DE WINDT, S. A. WITT, T. R. KIMBALL, B. E. MARKHAM et J. D. MOKENTIN (2001). "The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **276**(32): 30245-53.
- LIN, M. T. et T. E. ALBERTSON (2004). "Genomic polymorphisms in sepsis." *Crit Care Med* **32**(2): 569-79.

- LIU, M. S. (1990). "Mechanisms of myocardial membrane alterations in endotoxin shock: roles of phospholipase and phosphorylation." *Circ Shock* **30**(1): 43-9.
- LIU, M. S. et S. GHOSH (1986). "Myocardial sodium pump activity in endotoxin shock." *Circ Shock* **19**(2): 177-84.
- LIU, M. S. et L. L. WU (1992). "Heart sarcolemmal Ca²⁺ transport in endotoxin shock: II. Mechanism of impairment in ATP-dependent Ca²⁺ transport." *Mol Cell Biochem* **112**(2): 135-42.
- LOLIS, E. et R. BUCALA (2003). "Macrophage migration inhibitory factor." *Expert Opin Ther Targets* **7**(2): 153-64.
- LUBETSKY, J. B., A. DIOS, J. HAN, B. ALJABARI, B. RUZSICKA, R. MITCHELL, E. LOLIS et Y. AL-ABED (2002). "The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents." *J Biol Chem* **277**(28): 24976-82.
- LUE, H., R. KLEEMANN, T. CALANDRA, T. ROGER et J. BERNHAGEN (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease." *Microbes Infect* **4**(4): 449-60.
- MAJNO, G. et I. JORIS (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* **146**(1): 3-15.
- MAKITA, H., M. NISHIMURA, K. MIYAMOTO, T. NAKANO, Y. TANINO, J. HIROKAWA, J. NISHIHARA et Y. KAWAKAMI (1998). "Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation." *Am J Respir Crit Care Med* **158**(2): 573-9.
- MANN, D. L. (1996). "Stress activated cytokines and the heart." *Cytokine Growth Factor Rev* **7**(4): 341-54.

- MARTIN, G. S., D. M. MANNINO, S. EATON et M. MOSS (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." *N Engl J Med* **348**(16): 1546-54.
- MATSUNAGA, J., D. SINHA, L. PANNELL, C. SANTIS, F. SOLANO, G. J. WISTOW et V. J. HEARING (1999). "Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines." *J Biol Chem* **274**(6): 3268-71.
- MATZINGER, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045.
- MCDONALD, T. E., M. N. GRINMAN, C. M. CARTHY et K. R. WALLEY (2000). "Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(5): H2053-61.
- MEBAZAA, A., G. W. DE KEULENAER, X. PAQUERON, L. J. ANDRIES, P. RATAJCZAK, S. LANONE, C. FRELIN, D. LONGROIS, D. PAYEN, D. L. BRUTSAERT et S. U. SYS (2001). "Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy: role of endothelin, prostaglandins, and nitric oxide." *Circulation* **104**(25): 3137-44.
- MEDZHITOV, R., P. PRESTON-HURLBURT et C. A. JANEWAY, JR. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* **388**(6640): 394-7.
- MELDRUM, D. R. (1998). "Tumor necrosis factor in the heart." *Am J Physiol* **274**(3 Pt 2): R577-95.
- MITCHELL, R., M. BACHER, J. BERNHAGEN, T. PUSHKARSKAYA, M. F. SELDIN et R. BUCALA (1995). "Cloning and characterization of the gene for mouse macrophage migration inhibitory factor (MIF)." *J Immunol* **154**(8): 3863-70.

- MITCHELL, R. A., H. LIAO, J. CHESNEY, G. FINGERLE-ROWSON, J. BAUGH, J. DAVID et R. BUCALA (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 345-50.
- MITCHELL, R. A., C. N. METZ, T. PENG et R. BUCALA (1999). "Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action." *J Biol Chem* **274**(25): 18100-6.
- MORISCO, C., K. SETA, S. E. HARDT, Y. LEE, S. F. VATNER et J. SADOSHIMA (2001). "Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes." *J Biol Chem* **276**(30): 28586-97.
- MUNT, B., J. JUE, K. GIN, J. FENWICK et M. TWEEDDALE (1998). "Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study." *Crit Care Med* **26**(11): 1829-33.
- MUZIO, M., G. NATOLI, S. SACCANI, M. LEVRERO et A. MANTOVANI (1998). "The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)." *J Exp Med* **187**(12): 2097-101.
- MUZIO, M., J. NI, P. FENG et V. M. DIXIT (1997). "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." *Science* **278**(5343): 1612-5.
- NAGATA, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." *Exp Cell Res* **256**(1): 12-8.
- NAKAJIMA, H., A. HIRATA, Y. OGAWA, T. YONEHARA, K. YODA et M. YAMASAKI (1991). "A cytoskeleton-related gene, *uso1*, is required for

- intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **113**(2): 245-60.
- NARULA, J., P. PANDEY, E. ARBUSTINI, N. HAIDER, N. NARULA, F. D. KOLODZIE, B. DAL BELLO, M. J. SEMIGRAN, A. BIELSA-MASDEU, G. W. DEC, S. ISRAELS, M. BALLESTER, R. VIRMANI, S. SAXENA et S. KHARBANDA (1999). "Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8144-9.
- NATANSON, C., R. L. DANNER, M. P. FINK, T. J. MACVITTIE, R. I. WALKER, J. J. CONKLIN et J. E. PARRILLO (1988). "Cardiovascular performance with *E. coli* challenges in a canine model of human sepsis." *Am J Physiol* **254**(3 Pt 2): H558-69.
- NATHAN, C. F., M. L. KARNOVSKY et J. R. DAVID (1971). "Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes." *J Exp Med* **133**(6): 1356-76.
- NATHAN, C. F., H. G. REMOLD et J. R. DAVID (1973). "Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions." *J Exp Med* **137**(2): 275-90.
- NAUJOKAS, M. F., M. MORIN, M. S. ANDERSON, M. PETERSON et J. MILLER (1993). "The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44." *Cell* **74**(2): 257-68.
- NEVIERE, R., H. FAUVEL, C. CHOPIN, P. FORMSTECHE et P. MARCHETTI (2001). "Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(1): 218-25.

- NEVIERE, R., B. GUERY, S. MORDON, F. ZERIMECH, S. CHARRE, F. WATTEL et C. CHOPIN (2000). "Inhaled NO reduces leukocyte-endothelial cell interactions and myocardial dysfunction in endotoxemic rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(6): H1783-90.
- NEVIERE, R. R., G. CEPINSKAS, W. S. MADORIN, N. HOQUE, M. KARMAZYN, W. J. SIBBALD et P. R. KVIETYS (1999). "LPS pretreatment ameliorates peritonitis-induced myocardial inflammation and dysfunction: role of myocytes." *Am J Physiol* **277**(3 Pt 2): H885-92.
- NGUYEN, M. T., H. LUE, R. KLEEMANN, M. THIELE, G. TOLLE, D. FINKELMEIER, E. WAGNER, A. BRAUN et J. BERNHAGEN (2003). "The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis." *J Immunol* **170**(6): 3337-47.
- NISHIBORI, M., N. NAKAYA, A. TAHARA, M. KAWABATA, S. MORI et K. SAEKI (1996). "Presence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in ependyma, astrocytes and neurons in the bovine brain." *Neurosci Lett* **213**(3): 193-6.
- NISHINO, T., J. BERNHAGEN, H. SHIIKI, T. CALANDRA, K. DOHI et R. BUCALA (1995). "Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland." *Mol Med* **1**(7): 781-8.
- OGNIBENE, F. P., M. M. PARKER, C. NATANSON, J. H. SHELHAMER et J. E. PARRILLO (1988). "Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock." *Chest* **93**(5): 903-10.
- ONODERA, S., J. NISHIHIRA, K. IWABUCHI, Y. KOYAMA, K. YOSHIDA, S. TANAKA et A. MINAMI (2002). "Macrophage migration inhibitory factor up-

- regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways." *J Biol Chem* **277**(10): 7865-74.
- ONODERA, S., H. TANJI, K. SUZUKI, K. KANEDA, Y. MIZUE, A. SAGAWA et J. NISHIHARA (1999). "High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints." *Cytokine* **11**(2): 163-7.
- ORAL, H., G. W. DORN, 2ND et D. L. MANN (1997). "Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte." *J Biol Chem* **272**(8): 4836-42.
- PAGANI, F. D., L. S. BAKER, C. HSI, M. KNOX, M. P. FINK et M. S. VISNER (1992). "Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs." *J Clin Invest* **90**(2): 389-98.
- PARALKAR, V. et G. WISTOW (1994). "Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF)." *Genomics* **19**(1): 48-51.
- PARKER, M. M., K. E. MCCARTHY, F. P. OGNIBENE et J. E. PARRILLO (1990). "Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans." *Chest* **97**(1): 126-31.
- PARKER, M. M., J. H. SHELHAMER, S. L. BACHARACH, M. V. GREEN, C. NATANSON, T. M. FREDERICK, B. A. DAMSKE et J. E. PARRILLO (1984). "Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock." *Ann Intern Med* **100**(4): 483-90.
- PARKER, M. M., J. H. SHELHAMER, C. NATANSON, D. W. ALLING et J. E. PARRILLO (1987). "Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors

of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis." *Crit Care Med* **15**(10): 923-9.

- PARRILLO, J. E., C. BURCH, J. H. SHELHAMER, M. M. PARKER, C. NATANSON et W. SCHUETTE (1985). "A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance." *J Clin Invest* **76**(4): 1539-53.
- PASTRANA, D. V., N. RAGHAVAN, P. FITZGERALD, S. W. EISINGER, C. METZ, R. BUCALA, R. P. SCHLEIMER, C. BICKEL et A. L. SCOTT (1998). "Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor." *Infect Immun* **66**(12): 5955-63.
- PATTEN, M., E. KRAMER, J. BUNEMANN, C. WENCK, M. THOENES, T. WIELAND et C. LONG (2001). "Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo." *Pflugers Arch* **442**(6): 920-7.
- PAULUS, W. J., P. J. VANTRIMPONT et A. M. SHAH (1995). "Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans." *Circulation* **92**(8): 2119-26.
- PERSONS, D. L., E. M. YAZLOVITSKAYA et J. C. PELLING (2000). "Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin." *J Biol Chem* **275**(46): 35778-85.
- PINSKY, M. R. et P. RICO (2000). "Cardiac contractility is not depressed in early canine endotoxic shock." *Am J Respir Crit Care Med* **161**(4 Pt 1): 1087-93.
- PITTET, D., S. RANGEL-FRAUSTO, N. LI, D. TARARA, M. COSTIGAN, L. REMPE, P. JEBSON et R. P. WENZEL (1995). "Systemic inflammatory response

syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients." *Intensive Care Med* **21**(4): 302-9.

POELAERT, J., C. DECLERCK, D. VOGELAERS, F. COLARDYN et C. A. VISSER (1997). "Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock." *Intensive Care Med* **23**(5): 553-60.

POLTORAK, A., X. HE, I. SMIRNOVA, M. Y. LIU, C. VAN HUFFEL, X. DU, D. BIRDWELL, E. ALEJOS, M. SILVA, C. GALANOS, M. FREUDENBERG, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, B. LAYTON et B. BEUTLER (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* **282**(5396): 2085-8.

PONCE DE LEON-ROSALES, S. P., F. MOLINAR-RAMOS, G. DOMINGUEZ-CHERIT, M. S. RANGEL-FRAUSTO et V. G. VAZQUEZ-RAMOS (2000). "Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study." *Crit Care Med* **28**(5): 1316-21.

QURESHI, S. T., L. LARIVIERE, G. LEVEQUE, S. CLERMONT, K. J. MOORE, P. GROS et D. MALO (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." *J Exp Med* **189**(4): 615-25.

RANGEL-FRAUSTO, M. S., D. PITTET, M. COSTIGAN, T. HWANG, C. S. DAVIS et R. P. WENZEL (1995). "The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study." *Jama* **273**(2): 117-23.

REYES, W. J., S. BRIMIOULLE et J. L. VINCENT (1999). "Septic shock without documented infection: an uncommon entity with a high mortality." *Intensive Care Med* **25**(11): 1267-70.

- ROGER, T., J. DAVID, M. P. GLAUSER et T. CALANDRA (2001). "MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4." *Nature* **414**(6866): 920-4.
- ROGER, T., C. FROIDEVAUX, C. MARTIN et T. CALANDRA (2003). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4)." *J Endotoxin Res* **9**(2): 119-23.
- ROSENGREN, E., P. AMAN, S. THELIN, C. HANSSON, S. AHLFORS, P. BJORK, L. JACOBSSON et H. RORSMAN (1997). "The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase." *FEBS Lett* **417**(1): 85-8.
- ROSENGREN, E., R. BUCALA, P. AMAN, L. JACOBSSON, G. ODH, C. N. METZ et H. RORSMAN (1996). "The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction." *Mol Med* **2**(1): 143-9.
- SAITO, H., C. PATTERSON, Z. HU, M. S. RUNGE, U. TIPNIS, M. SINHA et J. PAPACONSTANTINO (2000). "Expression and self-regulatory function of cardiac interleukin-6 during endotoxemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(5): H2241-8.
- SANDS, K. E., D. W. BATES, P. N. LANKEN, P. S. GRAMAN, P. L. HIBBERD, K. L. KAHN, J. PARSONNET, R. PANZER, E. J. ORAV, D. R. SNYDMAN, E. BLACK, J. S. SCHWARTZ, R. MOORE, B. L. JOHNSON, JR. et R. PLATT (1997). "Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers." *Jama* **278**(3): 234-40.

- SANT, A. J., S. E. CULLEN et B. D. SCHWARTZ (1985). "Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins." *J Immunol* **135**(1): 416-22.
- SATO, A., T. S. UINUK-OOL, N. KURODA, W. E. MAYER, N. TAKEZAKI, R. DONGAK, F. FIGUEROA, M. D. COOPER et J. KLEIN (2003). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) of jawed and jawless fishes: implications for its evolutionary origin." *Dev Comp Immunol* **27**(5): 401-12.
- SHACHAR, I. et R. A. FLAVELL (1996). "Requirement for invariant chain in B cell maturation and function." *Science* **274**(5284): 106-8.
- SHAULIAN, E. et M. KARIN (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." *Nat Cell Biol* **4**(5): E131-6.
- SHE, Q. B., N. CHEN et Z. DONG (2000). "ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation." *J Biol Chem* **275**(27): 20444-9.
- SHIMIZU, T. (2005). "Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin." *J Dermatol Sci* **37**(2): 65-73.
- SIBBALD, W. J., J. MARSHALL, N. CHRISTOU, M. GIROTTI, D. MCCORMACK, O. ROSTEIN, C. MARTIN et J. MEAKINS (1991). "'Sepsis'--clarity of existing terminology. or more confusion?" *Crit Care Med* **19**(8): 996-8.
- SLEE, E. A., M. T. HARTE, R. M. KLUCK, B. B. WOLF, C. A. CASIANO, D. D. NEWMAYER, H. G. WANG, J. C. REED, D. W. NICHOLSON, E. S. ALNEMRI, D. R. GREEN et S. J. MARTIN (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." *J Cell Biol* **144**(2): 281-92.

- SORENSEN, T. I., G. G. NIELSEN, P. K. ANDERSEN et T. W. TEASDALE (1988). "Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees." *N Engl J Med* **318**(12): 727-32.
- SUBRAMANYA, H. S., D. I. ROPER, Z. DAUTER, E. J. DODSON, G. J. DAVIES, K. S. WILSON et D. B. WIGLEY (1996). "Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases." *Biochemistry* **35**(3): 792-802.
- SUFFREDINI, A. F., R. E. FROMM, M. M. PARKER, M. BRENNER, J. A. KOVACS, R. A. WESLEY et J. E. PARRILLO (1989). "The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin." *N Engl J Med* **321**(5): 280-7.
- SUGI, K., J. NEWALD, L. D. TRABER, J. P. MAGUIRE, D. N. HERNDON, G. SCHLAG et D. L. TRABER (1991). "Cardiac dysfunction after acute endotoxin administration in conscious sheep." *Am J Physiol* **260**(5 Pt 2): H1474-81.
- SUGIMOTO, H., M. TANIGUCHI, A. NAKAGAWA, I. TANAKA, M. SUZUKI et J. NISHIHARA (1999). "Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution." *Biochemistry* **38**(11): 3268-79.
- SUN, H. W., J. BERNHAGEN, R. BUCALA et E. LOLIS (1996). "Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5191-6.
- SUZUKI, M., H. SUGIMOTO, A. NAKAGAWA, I. TANAKA, J. NISHIHARA et M. SAKAI (1996). "Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver." *Nat Struct Biol* **3**(3): 259-66.

- SUZUKI, T., A. OGATA, K. TASHIRO, K. NAGASHIMA, M. TAMURA et J. NISHIHARA (1999). "Augmented expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the telencephalon of the developing rat brain." *Brain Res* **816**(2): 457-62.
- SUZUKI, Y. J. et T. EVANS (2004). "Regulation of cardiac myocyte apoptosis by the GATA-4 transcription factor." *Life Sci* **74**(15): 1829-38.
- SWOPE, M. D. et E. LOLIS (1999). "Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme?" *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**: 1-32.
- TAKAHASHI, M., J. NISHIHARA, M. SHIMPO, Y. MIZUE, S. UENO, H. MANO, E. KOBAYASHI, U. IKEDA et K. SHIMADA (2001). "Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes." *Cardiovasc Res* **52**(3): 438-45.
- TAO, S. et T. M. MCKENNA (1994). "In vitro endotoxin exposure induces contractile dysfunction in adult rat cardiac myocytes." *Am J Physiol* **267**(5 Pt 2): H1745-52.
- TAVERNIER, B., O. MAKHOTINE, G. LEBUFFE, J. DUPONT et P. SCHERPEREEL (1998). "Systolic pressure variation as a guide to fluid therapy in patients with sepsis-induced hypotension." *Anesthesiology* **89**(6): 1313-21.
- TAVERNIER, B., A. MEBAZAA, P. MATEO, S. SYS, R. VENTURA-CLAPIER et V. VEKSLER (2001). "Phosphorylation-dependent alteration in myofilament Ca^{2+} sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(2): 362-7.
- TESCH, G. H., D. J. NIKOLIC-PATERSON, C. N. METZ, W. MU, M. BACHER, R. BUCALA, R. C. ATKINS et H. Y. LAN (1998). "Rat mesangial cells express

- macrophage migration inhibitory factor in vitro and in vivo." *J Am Soc Nephrol* **9**(3): 417-24.
- TRACEY, K. J., Y. FONG, D. G. HESSE, K. R. MANOGUE, A. T. LEE, G. C. KUO, S. F. LOWRY et A. CERAMI (1987). "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia." *Nature* **330**(6149): 662-4.
- VEINSTEIN, A., A. WERNET et J. P. MIRA (2001). "[Septic shock]." *Rev Prat* **51**(6): 596-602.
- WAEBER, G., T. CALANDRA, R. RODUIT, J. A. HAEFLIGER, C. BONNY, N. THOMPSON, B. THORENS, E. TEMLER, A. MEINHARDT, M. BACHER, C. N. METZ, P. NICOD et R. BUCALA (1997). "Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4782-7.
- WEISER, W. Y., P. A. TEMPLE, J. S. WITEK-GIANNOTTI, H. G. REMOLD, S. C. CLARK et J. R. DAVID (1989). "Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19): 7522-6.
- WESCHE, H., W. J. HENZEL, W. SHILLINGLAW, S. LI et Z. CAO (1997). "MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex." *Immunity* **7**(6): 837-47.
- WEYRICH, A. S., X. L. MA, M. BUERKE, T. MUROHARA, V. E. ARMSTEAD, A. M. LEFER, J. M. NICOLAS, A. P. THOMAS, D. J. LEFER et J. VINTEN-JOHANSEN (1994). "Physiological concentrations of nitric oxide do not elicit an acute negative inotropic effect in unstimulated cardiac muscle." *Circ Res* **75**(4): 692-700.

- WISTOW, G. J., M. P. SHAUGHNESSY, D. C. LEE, J. HODIN et P. S. ZELENKA (1993). "A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1272-5.
- WRAIGHT, C. J., P. VAN ENDERT, P. MOLLER, J. LIPP, N. R. LING, I. C. MACLENNAN, N. KOCH et G. MOLDENHAUER (1990). "Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface." *J Biol Chem* **265**(10): 5787-92.
- WU, L. L. et M. S. LIU (1992). "Heart sarcolemmal Ca²⁺ transport in endotoxin shock: I. Impairment of ATP-dependent Ca²⁺ transport." *Mol Cell Biochem* **112**(2): 125-33.
- YAMAMOTO, M., K. TAKEDA et S. AKIRA (2004). "TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling." *Mol Immunol* **40**(12): 861-8.
- ZANETTI, G., D. HEUMANN, J. GERAIN, J. KOHLER, P. ABBET, C. BARRAS, R. LUCAS, M. P. GLAUSER et J. D. BAUMGARTNER (1992). "Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and to lipopolysaccharide." *J Immunol* **148**(6): 1890-7.